



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) 
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
1-0045936
(51)^{2006.01} C07K 16/18; A61K 45/06; A61K (13) B
31/713; A61K 39/00
-

- (21) 1-2020-02512 (22) 05/10/2018
(86) PCT/US2018/054720 05/10/2018 (87) WO 2019/071205 11/04/2019
(30) 62/569,436 06/10/2017 US; 62/598,965 14/12/2017 US
(45) 26/05/2025 446 (43) 25/11/2020 392A
(73) PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (IE)
77 Sir John Rogerson's Quay, Block C, Grand Canal Docklands, Dublin 2, D02
T804, Ireland
(72) SALMANS, Joshua Reginald (US); ALEXANDER, Svetlana (US); BARBOUR,
Robin (US); HIGAKI, Jeffrey N. (US); NIJJAR, Tarlochan S. (US).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D & N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)
-

- (54) KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VÀO
TRANSTHYRETIN VÀ ĐƯỢC PHẪM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2020-02512

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết đặc hiệu với transthyretin (TTR). Các kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tích tụ TTR hoặc tích tụ các lắng đọng TTR (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR). Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR, và để theo dõi tác dụng của các liệu pháp điều trị TTR, trong số các ứng dụng khác.

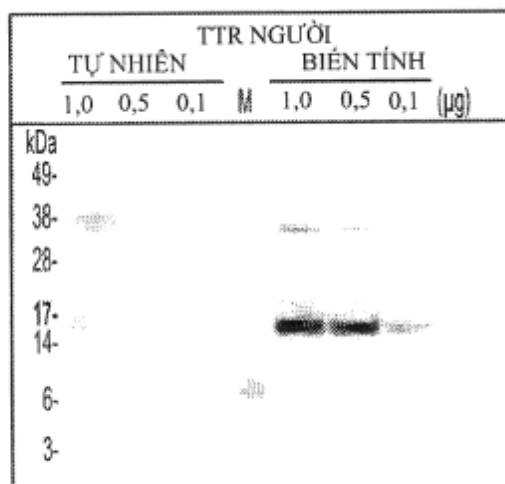


FIG. 1

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết đặc hiệu với transthyretin (TTR). Các kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tích tụ TTR hoặc tích tụ các lắng đọng TTR (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR). Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR, và để theo dõi tác dụng của các liệu pháp điều trị TTR, trong số các ứng dụng khác.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Một số bệnh được cho là bị gây ra bởi sự gấp và kết tụ bất thường của các protein đặc hiệu bệnh. Các protein này có thể tích tụ thành các khối tích tụ gây bệnh, được biết là các dạng tinh bột, mà nhìn thấy được nhờ một số chất nhuộm mô. Các dạng tinh bột được cho là gây ra các phản ứng viêm và dẫn đến nhiều hậu quả tiêu cực cho các mô liên quan. Thêm vào đó, các khối kết tụ nhỏ hơn của protein bị gấp bất thường có thể tồn tại và gây ra các tác dụng gây độc tế bào.

Transthyretin (TTR) là một trong nhiều protein đã được biết là gấp sai và kết tụ (ví dụ, trải qua sự tạo dạng tinh bột). Bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin (ATTR) bao gồm hai dạng bệnh: bệnh di truyền do gấp sai TTR đột biến hoặc biến đổi, và bệnh đơn phát, không di truyền bị gây ra bởi sự gấp sai và kết tụ TTR kiểu hoang. Quá trình sản sinh dạng tinh bột TTR có thể gây bệnh ở hệ thần kinh và/hoặc tim, cũng như ở các mô khác.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập liên kết đặc hiệu với TTR bị gấp sai và không liên kết với dạng tự nhiên của protein này. Ví dụ về các kháng thể này liên kết với epitop nằm trong các gốc axit amin 101-109 của vùng trưởng thành của SEQ ID NO:26.

Một số kháng thể này cạnh tranh để liên kết vào TTR người bị gấp sai với kháng thể 18C5. Một số kháng thể này liên kết vào cùng epitop trên transthyretin người với 18C5.

Một số kháng thể này chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 18C5, trong đó 18C5 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 81 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 87.

Một số kháng thể này chứa ba CDR chuỗi nặng như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 5, 7, và 9) và ba CDR chuỗi nhẹ như được xác định bởi tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 11, 13, và 15).

Một số kháng thể này là 18C5 hoặc dạng khảm, được nguy trang, hoặc được làm tương thích với người của nó. Một số kháng thể này liên kết với epitop nằm trong các vị trí 101-109 trong vùng trưởng thành của SEQ ID NO:26. Một số kháng thể này là kháng thể đơn dòng. Một số kháng thể này là kháng thể khảm, được làm tương thích với người, được nguy trang, hoặc của người. Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có tỉ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự của người. Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có tỉ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự của người. Trong một số kháng thể này, mỗi vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tự nhiên có tỉ lệ tương đồng $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người.

Một số kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người. Một số kháng thể này có isotyp IgG1 người. Một số kháng thể này có isotyp IgG2 hoặc IgG4 người.

Một số kháng thể này là kháng thể 18C5 khảm hoặc được làm tương thích với người liên kết đặc hiệu với transthyretin, trong đó 18C5 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:81 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:87. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng của 18C5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 18C5.

Trong một số kháng thể, các CDR là theo định nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Tổ hợp Kabat/Chothia của 18C5 (SEQ ID NO: 5, 7, và 9) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Tổ hợp

Kabat/Chothia của 18C5 (SEQ ID NO: 11, 13, và 15). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat của 18C5 (SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:9) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Kabat của 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 15). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Chothia của 18C5 (SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, và SEQ ID NO:9) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Chothia của 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 15). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM của 18C5 (SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, và SEQ ID NO:9) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ AbM của 18C5 (SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 15). Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact của 18C5 (SEQ ID NO 100-102) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact của 18C5 (SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:98, và SEQ ID NO:99).

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:85-86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 91-92.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H37 bị chiếm bởi V hoặc A, H45 bị chiếm bởi L hoặc Q, H47 bị chiếm bởi L hoặc W, H48 bị chiếm bởi L hoặc I, H49 bị chiếm bởi A hoặc G, và H94 bị chiếm bởi S hoặc R. Trong một số kháng thể, các vị trí H37, H45, H47, H48, H49 và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A, Q, W, I, G và R.

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

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 85-86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 91-92. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 85-86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 91-92.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số SEQ ID NO: 85-86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 91-92.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:91. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:85 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:92. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:91. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:92.

Trong một số kháng thể, kháng thể này là kháng thể nguyên vẹn. Trong một số kháng thể, kháng thể này là đoạn liên kết. Trong một số kháng thể này, đoạn liên kết này là kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab, hoặc đoạn Fab'2.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng. Trong một số kháng thể này, vùng hằng định chuỗi nặng này là dạng đột biến của vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người có khả năng liên kết với thụ thể Fcγ bị giảm so với vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người. Trong một số kháng thể này, vùng hằng định chuỗi nặng thuộc isotyp IgG1. Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng có trình tự của SEQ ID NO:22 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được dung

hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ có trình tự của SEQ ID NO:24.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa kháng thể thứ nhất theo điểm bất kỳ trong các điểm trước, kháng thể thứ hai liên kết với epitop của TTR khác với epitop được liên kết bởi 18C5, và chất mang được dụng. Trong một số được phẩm này, kháng thể thứ hai là 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, hoặc dạng khảm hoặc dạng được làm tương thích với người của nó. Trong một số được phẩm này, kháng thể thứ hai là kháng thể liên kết trong các gốc 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, hoặc 115-127 của TTR.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể đặc hiệu kép chứa hai vùng liên kết kháng nguyên, vùng chức năng liên kết kháng nguyên thứ nhất liên kết đặc hiệu trong các gốc 101-109 của TTR và vùng chức năng liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết đặc hiệu với vùng khác của TTR. Trong một số kháng thể đặc hiệu kép này, vùng chức năng liên kết kháng nguyên thứ hai là vùng chức năng liên kết kháng nguyên từ 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, hoặc dạng khảm hoặc dạng được làm tương thích với người của nó. Trong một số kháng thể đặc hiệu kép này, vùng chức năng liên kết kháng nguyên thứ hai liên kết trong các gốc 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, hoặc 115-127 của TTR.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất được phẩm chứa bất kỳ trong số các kháng thể mới đã đề cập trên đây và chất mang được dụng.

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

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm cho kháng thể tương thích với người, phương pháp này bao gồm:

- (a) chọn kháng thể nhận của người;
- (b) xác định các gốc axit amin của kháng thể chuột cần được giữ lại;
- (c) tổng hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nặng kháng thể chuột và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nhẹ kháng thể chuột; và
- (d) biểu hiện các axit nucleic này trong tế bào chủ để sản sinh ra kháng thể được làm tương thích với người;

trong đó kháng thể chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:81 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:87.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản sinh kháng thể được làm tương thích với người, khám hoặc được ngụ ý trang, phương pháp này bao gồm:

- (a) nuôi cấy các tế bào đã được biến nạp bằng các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể, nhờ đó các tế bào tiết ra kháng thể này; và
- (b) tinh chế kháng thể này từ môi trường nuôi cấy tế bào; trong đó kháng thể này là dạng được làm tương thích với người, khám hoặc được ngụ ý trang của 18C5.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản sinh dòng tế bào sản sinh kháng thể được làm tương thích với người, khám hoặc được ngụ ý trang, phương pháp này bao gồm:

- (a) đưa vector mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể và gen đánh dấu chọn lọc được vào trong các tế bào;
- (b) nhân giống các tế bào này trong các điều kiện để chọn lọc các tế bào có số lượng bản sao của vector này gia tăng;
- (c) phân lập từng tế bào từ các tế bào đã chọn lọc; và
- (d) tạo ngân hàng tế bào được tách dòng từ từng tế bào đã được chọn lọc dựa vào hiệu suất kháng thể;

trong đó kháng thể này là dạng được làm tương thích với người, khám hoặc được ngụ ý trang của 18C5.

Một số phương pháp này còn bao gồm bước nhân giống tế bào trong các điều kiện chọn lọc và sàng lọc các dòng tế bào biểu hiện tự nhiên và tiết ra ít nhất 100 mg/L/10⁶ tế bào/24 giờ.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ transthyretin ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng phác đồ hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể mới đã được đề cập trên đây, nhờ đó ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ transthyretin ở đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế hoặc làm giảm sự tạo thành sợi transthyretin ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng phác đồ hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể mới đã được đề cập trên đây, nhờ đó ức chế hoặc làm giảm sự tạo thành sợi transthyretin ở đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm các kết tụ và lắng đọng transthyretin ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng phác đồ hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể mới đã được đề cập trên đây, nhờ đó làm giảm các lắng đọng transthyretin ở đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp loại bỏ dạng tinh bột transthyretin ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể mới đã được đề cập trên đây, nhờ đó loại bỏ dạng tinh bột transthyretin khỏi đối tượng này so với đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin mà không nhận được kháng thể.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể mới đã được đề cập trên đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm chậm sự khởi phát của

bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng phác đồ hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể mới đã được đề cập trên đây.

Trong một số phương pháp này, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin đi kèm theo tình trạng được chọn từ bất kỳ trong số bệnh cơ tim hoặc bệnh phì đại tim, bệnh viêm đa dây thần kinh dạng tinh bột di truyền, bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (CNSA), bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già, bệnh thoái hóa dạng tinh bột ở tim do tuổi già, hẹp ống tủy sống, thoái hóa khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp thiếu niên tự phát, thoái hóa điểm vàng do tuổi già, và rối loạn dây chằng hoặc gân.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị cho đối tượng mắc hoặc có nguy cơ bị mắc bất kỳ trong số bệnh cơ tim hoặc bệnh phì đại tim, bệnh viêm đa dây thần kinh dạng tinh bột di truyền, bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (CNSA), bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già, bệnh thoái hóa dạng tinh bột ở tim do tuổi già, hẹp ống tủy sống, thoái hóa khớp, viêm khớp dạng thấp, viêm khớp thiếu niên tự phát, thoái hóa điểm vàng do tuổi già, và rối loạn gân hoặc dây chằng, phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể mới đã được đề cập trên đây.

Trong một số phương pháp này, kháng thể này được sử dụng kết hợp với kháng thể thứ hai liên kết với epitop của TTR khác với epitop được liên kết bởi 18C5. Trong một số phương pháp này, kháng thể thứ hai là 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, hoặc dạng khám hoặc được làm tương thích với người của chúng. Trong một số các phương pháp này, kháng thể thứ hai liên kết trong các gốc 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, hoặc 115-127 của TTR.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể này được sử dụng như liệu pháp đơn.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước cho mẫu sinh học của đối tượng này tiếp xúc với lượng hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể mới đã được đề cập trên đây. Một số phương pháp này còn bao gồm bước cho mẫu sinh học của đối tượng này tiếp

xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể thứ hai liên kết với epitop của TTR khác với epitop được liên kết bởi 18C5. Trong một số phương pháp này, kháng thể thứ hai là 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, 8C3, 7G7, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MDF102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, hoặc dạng khám hoặc được làm tương thích với người của chúng. Trong một số phương pháp này, kháng thể thứ hai liên kết trong các gốc 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, hoặc 115-127 của TTR.

Một số phương pháp này còn bao gồm bước phát hiện sự liên kết của kháng thể với transthyretin, trong đó sự có mặt của kháng thể đã liên kết chỉ ra là đối tượng này đã mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin.

Một số phương pháp này còn bao gồm bước so sánh khả năng liên kết của kháng thể này với mẫu sinh học với khả năng liên kết của kháng thể này với mẫu đối chứng, từ đó khả năng liên kết của kháng thể với mẫu sinh học tăng so với mẫu đối chứng chỉ ra là đối tượng này đã mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin.

Trong một số phương pháp này, mẫu sinh học và mẫu đối chứng chứa các tế bào có cùng nguồn gốc mô. Trong một số phương pháp này, mẫu sinh học và/hoặc mẫu đối chứng là máu, huyết thanh, huyết tương, hoặc mô rắn. Trong một số phương pháp này, mô rắn là từ tim, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thần kinh thực vật, thận, mắt, mỡ bụng hoặc đường tiêu hóa.

Trong một số phương pháp này, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin là bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin có tính di truyền hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin đơn phát. Trong một số phương pháp này, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin có tính di truyền là bệnh cơ tim dạng tinh bột có tính di truyền (FAC), bệnh viêm đa dây thần kinh do dạng tinh bột có tính di truyền (FAP), hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (CNSA). Trong một số phương pháp này, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin đơn phát là bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già (SSA) hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột tim do tuổi già (SCA).

Trong một số phương pháp này, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin đi kèm theo sự tích tụ dạng tinh bột ở tim, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thần kinh thực vật,

thận, mắt, mỡ bụng, hoặc đường tiêu hóa của đối tượng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt hoặc vắng mặt của các lắng đọng transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước cho mẫu sinh học của đối tượng bị nghi ngờ có tích tụ dạng tinh bột tiếp xúc với lượng hữu hiệu của bất kỳ trong số các kháng thể mới được đề cập trên đây.

Một số phương pháp này còn bao gồm thêm bước phát hiện sự liên kết của kháng thể với transthyretin, trong đó việc phát hiện ra kháng thể đã liên kết chỉ ra sự có mặt của các lắng đọng transthyretin.

Một số phương pháp này còn bao gồm bước so sánh khả năng liên kết của kháng thể này với mẫu sinh học với khả năng liên kết của kháng thể này với mẫu đối chứng, từ đó khả năng liên kết của kháng thể với mẫu sinh học tăng so với mẫu đối chứng chỉ ra là đối tượng này đã mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin.

Trong một số phương pháp này, mẫu sinh học và mẫu đối chứng chứa các tế bào có cùng nguồn gốc mô. Trong một số phương pháp này, trong đó mẫu sinh học và/hoặc mẫu đối chứng này là máu, huyết thanh, huyết tương, hoặc mô rắn. Trong một số phương pháp này, trong đó mô rắn là từ tim, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thần kinh thực vật, thận, mắt, mỡ bụng hoặc đường tiêu hóa.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định mức lắng đọng transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng bất kỳ trong số các kháng thể đã đề cập trên đây và phát hiện sự có mặt của kháng thể đã liên kết ở đối tượng này. Trong một số phương pháp này, sự có mặt của kháng thể đã liên kết được xác định bằng kỹ thuật chụp positron cắt lớp (PET).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng phác đồ hữu hiệu của chất làm ổn định TTR tetrame, liệu pháp điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa, liệu pháp điều trị dựa trên can thiệp ARN (RNAi) hoặc doxycycline cộng với axit taurooursodeoxycholic, trong đó đối tượng này đã được điều trị trước đó bằng bất kỳ trong số các kháng thể đã được đề cập trên đây. Trong một số phương pháp này, đối tượng này không còn được điều trị bằng kháng thể này. Trong một số phương pháp này, chất ổn định

tetrame TTR là tafamidis hoặc diflunisal. Trong một số phương pháp này, liệu pháp điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa là inotersen. Trong một số phương pháp này, liệu pháp điều trị dựa trên ARNi là patisiran hoặc revusiran.

Trong một số phương pháp, kháng thể này được sử dụng kết hợp với chất làm ổn định TTR tetrame, liệu pháp điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa, liệu pháp điều trị dựa trên can thiệp ARN (RNAi) hoặc doxycycline cộng với axit tauroursodeoxycholic. Trong một số phương pháp này, chất ổn định tetrame TTR là tafamidis hoặc diflunisal. Trong một số phương pháp này, liệu pháp điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa là inotersen. Trong một số phương pháp này, liệu pháp điều trị dựa trên ARNi là patisiran hoặc revusiran.

Trong một số phương pháp, kháng thể này được sử dụng đồng thời với chất làm ổn định TTR tetrame, liệu pháp điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa, liệu pháp điều trị dựa trên can thiệp ARN (RNAi) hoặc doxycycline cộng với axit tauroursodeoxycholic. Trong một số phương pháp này, chất ổn định tetrame TTR là tafamidis hoặc diflunisal. Trong một số phương pháp này, chất ổn định tetrame TTR là diflunisal. Trong một số phương pháp này, liệu pháp điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa là inotersen. Trong một số phương pháp này, liệu pháp điều trị dựa trên ARNi là patisiran hoặc revusiran.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định kháng thể liên kết với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR, bao gồm các bước: (a) gây miễn dịch cho động vật bằng TTR hoặc một đoạn của nó; và (b) sàng lọc kháng thể đã cảm ứng được để xác định kháng thể liên kết trong các gốc 101-109 của TTR. Trong một số phương pháp, bước gây miễn dịch được thực hiện với đoạn không dài hơn 25 gốc liên kề của TTR bao gồm ít nhất 3 gốc liên kề nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Trong một số phương pháp, đoạn này chứa các gốc 101-109 của TTR, tùy ý được liên kết với chất mang. Trong một số phương pháp, bước sàng lọc được thực hiện bằng cách xác định sự liên kết của kháng thể với đoạn TTR chứa các gốc 101-109 của TTR.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định kháng thể liên kết với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR: bao gồm các bước: cung cấp thư viện biểu hiện của kháng thể; và sàng lọc thư viện biểu hiện này để xác định kháng thể liên kết trong các gốc 101- 109 của TTR. Trong một số phương pháp, thư viện biểu hiện này biểu

hiện các kháng thể dưới dạng các đoạn Fv. Trong một số phương pháp, thư viện biểu hiện này là thư viện biểu hiện chưa từng tham gia thử nghiệm. Trong một số phương pháp, thư viện biểu hiện này được sản sinh bằng cách gây miễn dịch động vật gặm nhấm bằng TTR hoặc một đoạn của nó và tách dòng axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể vào vector biểu hiện. Trong một số phương pháp, bước sàng lọc được thực hiện bằng cách xác định khả năng liên kết của các thành viên thư viện với đoạn TTR chứa các gốc 101-109. Trong một số phương pháp, bước sàng lọc được thực hiện bằng cách xác định khả năng liên kết của các thành viên thư viện với TTR khi có mặt kháng thể tham chiếu, mà liên kết với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Trong một số phương pháp, kháng thể tham chiếu là 18C5.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định kháng thể cạnh tranh liên kết với kháng thể 18C5 để liên kết với TTR, bao gồm bước cho TTR tiếp xúc với kháng thể này khi có mặt và vắng mặt kháng thể 18C5 và xác định khả năng liên kết của kháng thể này với TTR, trong đó khả năng liên kết giảm khi có mặt kháng thể 18C5 chỉ ra là kháng thể này cạnh tranh với kháng thể 18C5 để liên kết với TTR.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định kháng thể liên kết vào cùng một epitop với kháng thể 18C5 trên TTR, bao gồm: (a) xác định epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR; (b) gây miễn dịch cho động vật bằng TTR hoặc một đoạn của nó; và (c) sàng lọc kháng thể đã cảm ứng được để xác định kháng thể liên kết vào cùng một epitop với kháng thể 18C5. Trong một số phương pháp, epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR được xác định bằng phương pháp gây đột biến TTR. Trong một số phương pháp, epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR được xác định bằng phương pháp tinh thể học tia X.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp xác định kháng thể liên kết vào cùng một epitop với kháng thể 18C5 trên TTR, bao gồm: (a) xác định epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR; (b) cung cấp thư viện biểu hiện của kháng thể; và (c) sàng lọc thư viện biểu hiện này để xác định kháng thể liên kết vào cùng một epitop với kháng thể 18C5. Trong một số phương pháp, epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR được xác định bằng phương pháp gây đột biến TTR. Trong một số phương pháp, epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR được xác định bằng phương pháp tinh

thể học tia X. Trong một số phương pháp, thư viện biểu hiện này biểu hiện các kháng thể dưới dạng các đoạn Fv. Trong một số phương pháp, thư viện biểu hiện này là thư viện biểu hiện chưa từng tham gia thử nghiệm. Trong một số phương pháp, thư viện biểu hiện này được sản sinh bằng cách gây miễn dịch động vật gặm nhấm bằng TTR hoặc một đoạn của nó và tách dòng axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể vào vector biểu hiện. Trong một số phương pháp, bước sàng lọc được thực hiện bằng cách xác định khả năng liên kết của các thành viên thư viện với đoạn TTR chứa các gốc 101-109. Trong một số phương pháp, bước sàng lọc được thực hiện bằng cách xác định khả năng liên kết của các thành viên thư viện với TTR khi có mặt kháng thể tham chiếu, mà liên kết với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Trong một số phương pháp, kháng thể tham chiếu là 18C5. Trong một số phương pháp, mỗi thành viên của thư viện biểu hiện này biểu hiện vùng biến đổi chuỗi nhẹ giống nhau và vùng biến đổi chuỗi nặng khác nhau. Trong một số phương pháp, vùng biến đổi chuỗi nhẹ là vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 18C5. Trong một số phương pháp, vùng biến đổi chuỗi nặng thu được từ thư viện của các vùng biến đổi chuỗi nặng của người được sắp xếp lại. Trong một số phương pháp, mỗi thành viên của thư viện biểu hiện này biểu hiện vùng biến đổi chuỗi nặng giống nhau và vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác nhau. Trong một số phương pháp, vùng biến đổi chuỗi nặng là vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 18C5. Trong một số phương pháp, vùng biến đổi chuỗi nhẹ thu được từ thư viện của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của người được sắp xếp lại.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng bao gồm bước sử dụng kháng nguyên chứa peptit TTR chứa đến 20 axit amin liên kề của TTR mà liên kết đặc hiệu với kháng thể 18C5, trong đó peptit này, một mình và/hoặc khi được liên kết với chất mang khác loại, cảm ứng sự tạo thành kháng thể liên kết đặc hiệu với TTR ở đối tượng.

Trong một số phương pháp, kháng nguyên này chứa epitop mà liên kết đặc hiệu với kháng thể 18C5. Trong một số phương pháp, kháng nguyên này chứa peptit TTR chứa đến 20 axit amin liên kề từ các gốc 89-127 của TTR. Trong một số phương pháp, kháng nguyên này chứa peptit TTR chứa đến 11 axit amin liên kề từ các gốc 100-110 của TTR. Trong một số phương pháp, kháng nguyên này chứa peptit TTR chứa đến 9 axit amin liên kề từ các gốc 101-109 của TTR.

Trong một số phương pháp, epitop của peptit TTR chứa 4-11 axit amin liền kề từ các gốc 89-127 của TTR. Trong một số phương pháp, epitop của peptit TTR chứa 4-11 axit amin liền kề từ các gốc 100-110 của TTR. Trong một số phương pháp, epitop của peptit TTR chứa 4-9 axit amin liền kề từ các gốc 101-109 của TTR.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng nguyên chứa peptit TTR chứa đến 20 axit amin liền kề từ các gốc 89-127 của TTR được liên kết với chất mang khác loại giúp tạo ra kháng thể kháng lại peptit TTR.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 mô tả kết quả của thử nghiệm thấm tách Western chỉ ra là 18C5 có khả năng phản ứng mạnh với monome TTR biến tính, phản ứng yếu hơn với dime biến tính, và phản ứng rất yếu với các dạng TTR tự nhiên.

Fig.2 mô tả kết quả của thử nghiệm thấm tách Western chỉ ra rằng kháng thể TTR thương mại không thể phân biệt giữa TTR tự nhiên với TTR biến tính và chỉ ra khả năng phản ứng rất mạnh với TTR tự nhiên và bị biến tính dạng monome cũng như dime.

Fig.3 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 18C5 của chuột (SEQ ID NO: 81), trình tự dòng mầm của người IGHV3-48*01 (SEQ ID NO:84), trình tự nhận của người 5VZY-VH_huFrwk (Crenefab-VH) (SEQ ID NO:83), và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 18C5 (hu18C5_VH-v1 và hu18C5_VH-v2, SEQ ID NO: 84 và 85, tương ứng). CDR được xác định theo tổ hợp Kabat/Chothia được in đậm trong trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng 18C5 của chuột.

Fig.4 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 18C5 của chuột (SEQ ID NO:87), trình tự dòng mầm của người IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:90), trình tự nhận của người 5VZY-VL_huFrwk (Crenefab-VL) (SEQ ID NO:89), và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 18C5 (hu18C5-VL-v1 và hu18C5-VL-v2, SEQ ID NO: 91 và 92, tương ứng). Các CDR được xác định theo tổ hợp Kabat/Chothia được in đậm trong trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ 18C5 của chuột.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 18C5 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:2 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 18C5 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:3 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 18C5 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:4 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 18C5 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO:5 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO:6 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO:7 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO:8 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa CDR-H2 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO:9 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 10 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa CDR-H3 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 11 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 12 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa CDR-L1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 13 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 14 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa CDR-L2 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 15 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 16 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa CDR-L3 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 17 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng 18C5 khảm (IgG1 người).

SEQ ID NO: 18 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng 18C5 khảm (IgG1 người).

SEQ ID NO: 19 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ 18C5 khảm (kappa người).

SEQ ID NO:20 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ 18C5 khảm (kappa người).

SEQ ID NO:21 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 được lấy làm ví dụ.

SEQ ID NO:22 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 G1m3 được lấy làm ví dụ.

SEQ ID NO:23 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 G1m3 được lấy làm ví dụ.

SEQ ID NO:24 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ với Arginin đầu cùng N.

SEQ ID NO:25 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ mà không có Arginin đầu cùng N.

SEQ ID NO:26 thể hiện trình tự axit amin của transthyretin người được chỉ ra bằng số truy cập P02766.1 (UniProt).

SEQ ID NO:27 thể hiện trình tự axit amin của transthyretin người được chỉ ra bằng số truy cập AAB35639.1 (GenBank).

SEQ ID NO:28 thể hiện trình tự axit amin của transthyretin người được chỉ ra bằng số truy cập AAB35640.1 (GenBank).

SEQ ID NO:29 thể hiện trình tự axit amin của transthyretin người được chỉ ra bằng số truy cập ABI63351.1 (GenBank).

SEQ ID NO:30 thể hiện trình tự axit amin của các gốc 101-109 của transthyretin người.

SEQ ID NO:31 thể hiện trình tự axit amin của các gốc 87-127 của transthyretin người.

SEQ ID NO:32 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 G1m3 được lấy làm ví dụ.

SEQ ID NO:33 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ có Arginin đầu cùng N.

SEQ ID NO:34 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ mà không có Arginin đầu cùng N.

SEQ ID NO:35 thể hiện trình tự axit amin của peptit tín hiệu vùng hằng định chuỗi nặng.

SEQ ID NO:36 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu vùng hằng định chuỗi nặng.

SEQ ID NO:37 thể hiện trình tự axit amin của peptit tín hiệu vùng hằng định chuỗi nhẹ.

SEQ ID NO:38 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu vùng hằng định chuỗi nhẹ.

SEQ ID NO: 39 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 14G8.

SEQ ID NO: 40 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 14G8.

SEQ ID NO: 41 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 14G8.

SEQ ID NO: 42 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 14G8.

SEQ ID NO: 43 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 14G8.

SEQ ID NO: 44 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 14G8.

SEQ ID NO: 45 thể hiện trình tự axit amin của epitop của kháng thể 5A1.

SEQ ID NO: 46 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 5A1.

SEQ ID NO: 47 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 5A1.

SEQ ID NO: 48 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 5A1.

SEQ ID NO: 49 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 5A1.

SEQ ID NO: 50 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 5A1.

SEQ ID NO: 51 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 5A1.

SEQ ID NO: 52 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 6C1.

SEQ ID NO: 53 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 6C1.

SEQ ID NO: 54 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 6C1.

SEQ ID NO: 55 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 6C1.

SEQ ID NO: 56 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 6C1.

SEQ ID NO: 57 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 6C1.

SEQ ID NO: 58 thể hiện trình tự axit amin của vùng VH của kháng thể AD7F6.

SEQ ID NO: 59 thể hiện trình tự axit amin của vùng VL của kháng thể AD7F6.

SEQ ID NO: 60 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 của kháng thể RT24.

SEQ ID NO: 61 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 của kháng thể RT24.

SEQ ID NO: 62 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 của kháng thể RT24.

SEQ ID NO: 63 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 của kháng thể RT24.

SEQ ID NO: 64 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 của kháng thể RT24.

SEQ ID NO: 65 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 của kháng thể RT24.

SEQ ID NO: 66 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 của kháng thể NI-301.35G11.

SEQ ID NO: 67 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 của kháng thể NI-301.35G11.

SEQ ID NO: 68 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 của kháng thể NI-301.35G11.

SEQ ID NO: 69 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 của kháng thể NI-301.35G11.

SEQ ID NO: 70 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 của kháng thể NI-301.35G11.

SEQ ID NO: 71 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 của kháng thể NI-301.35G11.

SEQ ID NO: 72 thể hiện trình tự axit amin của epitop của các kháng thể MFD101, MDF102, MFD103, MFD105.

SEQ ID NO: 73 thể hiện trình tự axit amin của epitop của các kháng thể MFD107, MFD 08, MFD 09, MFD111.

SEQ ID NO: 74 thể hiện trình tự axit amin của epitop của kháng thể MFD114.

SEQ ID NO: 75 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 9D5.

SEQ ID NO: 76 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 9D5.

SEQ ID NO: 77 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 9D5.

SEQ ID NO: 78 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 9D5.

SEQ ID NO: 79 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 9D5.

SEQ ID NO: 80 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 9D5.

SEQ ID NO: 81 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 82 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của Fab kháng pyroglutamat-kháng thể Abeta chuột c#17 số truy cập GenBank 1212215935.

SEQ ID NO: 83 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của Crenezumab Fab (CreneFab) PDB được làm tương thích với người: 5VZY, Số truy cập GenBank là 1229749875.

SEQ ID NO: 84 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của trình tự dòng mầm của người IGHV3-48*01, số truy cập GenBank 1FN550289.1.

SEQ ID NO: 85 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng củakháng

thể 18C5 được làm tương thích với người hu18C5-VH_1.

SEQ ID NO: 86 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 18C5 được làm tương thích với người hu18C5-VH_2.

SEQ ID NO:87 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 88 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của Fab kháng pyroglutamat-kháng thể Abeta chuột c#17, số truy cập GenBank 1212215934.

SEQ ID NO: 89 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của Crenezumab Fab (CreneFab) PDB được làm tương thích với người: 5VZY, Số truy cập GenBank là 1229749876.

SEQ ID NO: 90 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của trình tự dòng mầm của người IGKV2-30*2, số truy cập GenBank CAA77315.

SEQ ID NO: 91 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 18C5 được làm tương thích với người hu18C5-VL_1.

SEQ ID NO: 92 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 18C5 được làm tương thích với người hu18C5-VL_2.

SEQ ID NO: 93 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 94 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 95 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Contact của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 96 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Chothia của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 97 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 AbM của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 98 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Contact của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 99 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Contact của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 100 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Contact của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 101 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Contact của kháng thể 18C5 của chuột.

SEQ ID NO: 102 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Contact của kháng thể 18C5 của chuột.

Định nghĩa

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

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

Đơn vị cấu trúc kháng thể cơ bản là tetrame của các tiểu đơn vị. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi “nhẹ” (khoảng 25 kDa) và

một chuỗi “nặng” (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu cùng-amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi chứa khoảng từ 100 đến 110 hoặc nhiều axit amin chủ yếu chịu trách nhiệm về việc nhận biết kháng nguyên. Vùng biến đổi này ban đầu được biểu hiện liên kết với peptit tín hiệu cắt được. Vùng biến đổi không có peptit tín hiệu đôi khi được gọi là vùng biến đổi trưởng thành. Vì vậy, ví dụ, vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ có nghĩa là vùng biến đổi chuỗi nhẹ không có peptit tín hiệu chuỗi nhẹ. Phần đầu cùng carboxy của mỗi chuỗi xác định vùng hằng định chủ yếu chịu trách nhiệm về chức năng hiệu ứng.

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

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc nặng globulin miễn dịch (còn được gọi ở đây lần lượt là “vùng chức năng biến đổi chuỗi nhẹ” (“vùng chức năng VL”) hoặc “vùng chức năng biến đổi chuỗi nặng” (“vùng chức năng VH”)) chứa vùng “khung” bị gián đoạn bởi ba “vùng quyết định bổ sung” hoặc “CDR”. Các vùng khung có tác dụng sắp xếp thẳng hàng các CDR để liên kết đặc hiệu với epitop của kháng nguyên. Các CDR này bao gồm các gốc axit amin của kháng thể mà chủ yếu chịu trách nhiệm về sự liên kết kháng nguyên. Từ đầu cùng amino đến đầu cùng carboxyl, cả vùng chức năng VL và VH đều chứa các vùng khung (FR) và CDR sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Các CDR 1, 2, và 3 của vùng chức năng VL còn được gọi ở đây lần lượt là CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3; các CDR 1, 2, và 3 của vùng chức năng VH còn được gọi ở đây lần lượt là CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3.

Việc gán các axit amin vào mỗi vùng chức năng VL và VH tuân theo định nghĩa thông thường bất kỳ về các CDR. Các định nghĩa thông thường bao gồm, định nghĩa Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 và 1991), định nghĩa Chothia (Chothia & Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia và đồng tác giả, *Nature* 342:878-883, 1989); tổ hợp của CDR Chothia

Kabat trong đó CDR-H1 là tổ hợp của các CDR Chothia và Kabat; định nghĩa AbM được sử dụng bởi phần mềm tạo mô hình kháng thể của Oxford Molecular; và, định nghĩa Contact của Martin và đồng tác giả (bioinfo.org.uk/abs) (xem Bảng 1). Kabat cung cấp quy ước đánh số được sử dụng rộng rãi (cách đánh số Kabat) trong đó các gốc tương ứng giữa các chuỗi nặng khác nhau hoặc giữa các chuỗi nhẹ khác nhau được đánh cùng một số. Khi kháng thể được cho là chứa các CDR theo một định nghĩa về CDR (ví dụ, Kabat), thì định nghĩa này xác định số lượng các gốc CDR tối thiểu có mặt trong kháng thể này (nghĩa là, các CDR Kabat). Không loại trừ là các gốc khác thuộc định nghĩa CDR thông thường khác nhưng nằm ngoài định nghĩa đã chỉ ra này cũng có mặt. Ví dụ, kháng thể chứa các CDR được xác định bởi Kabat bao gồm, trong số các khả năng có thể khác, kháng thể trong đó các CDR này chứa các gốc CDR Kabat và không chứa các gốc CDR khác, và kháng thể trong đó CDR H1 là CDR H1 tổ hợp Chothia-Kabat và các CDR khác chứa các gốc CDR Kabat và không chứa thêm các gốc CDR theo các định nghĩa khác.

Bảng 1:

Định nghĩa thông thường về CDR sử dụng cách đánh số Kabat

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L24--L34	L30--L36
L2	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L50--L56	L46--L55
L3	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L97	L89--L96
H1	H31--H35B	H26--H32..H34*	H26--H35B*	H26--H35B	H30--H35B
H2	H50--H65	H52--H56	H50--H65	H50--H58	H47--H58
H3	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H95--H102	H93--H101

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

nó kết thúc ở H34.

Thuật ngữ “kháng thể” bao gồm các kháng thể nguyên vẹn và các đoạn liên kết của chúng. Thông thường, các đoạn cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn đã sinh ra chúng để liên kết đặc hiệu với đích bao gồm các chuỗi nặng riêng biệt, các chuỗi nhẹ Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂c, Dabs, các kháng thể nano, và Fv. Các đoạn có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách tách bằng enzym hoặc hóa học các globulin miễn dịch nguyên vẹn. Thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể được làm tương thích với người. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể hai chức là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết khác nhau (xem, ví dụ, Songsivilai và Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny và đồng tác giả, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau này bao gồm cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ 18C5 được làm tương thích với người và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ đặc hiệu với một epitop trên transthyretin khác với epitop được liên kết bởi 18C5.

Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, một cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ là kháng thể 18C5 được làm tương thích với người như được mô tả thêm dưới đây và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ còn lại là từ kháng thể liên kết với thụ thể được biểu hiện trên hàng rào máu não, chẳng hạn như thụ thể insulin, thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin (insulin-like growth factor: IGF), thụ thể leptin, hoặc thụ thể lipoprotein, hoặc thụ thể transferrin (Friden và đồng tác giả *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden và đồng tác giả, *Science* 259:373-377, 1993). Kháng thể đặc hiệu kép này có thể được vận chuyển qua hàng rào máu não bằng cơ chế chuyển bào qua trung gian thụ thể. Sự hấp thu ở não của kháng thể đặc hiệu kép này có thể được tăng cường thêm bằng cách thao tác di truyền kháng thể đặc hiệu kép này để làm giảm ái lực của nó với thụ thể hàng rào máu não. Ái lực với thụ thể này được làm giảm dẫn đến sự phân bố kháng thể này rộng hơn trong não (xem, ví dụ, Atwal. và đồng tác giả, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu và đồng tác giả, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra44, 2011).

Các kháng thể đặc hiệu kép điển hình cũng có thể là: (1) kháng thể vùng-biến đổi-kép (DVD-Ig), trong đó mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa hai vùng biến đổi nối tiếp nhau qua liên kết peptit ngắn (Wu và đồng tác giả, *Generation and Characterization of a Dual*

Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, mà là thể dung hợp của hai kháng thể dime chuỗi đơn tạo ra kháng thể đặc hiệu kép hóa trị bốn có hai vị trí liên kết cho mỗi kháng nguyên đích; (3) thể linh hoạt, mà là sự kết hợp của các scFv với kháng thể dime tạo ra phân tử đa hóa trị; (4) phân tử được gọi là phân tử “neo và khóa”, dựa trên “vùng dime hóa và neo” ở Protein Kinase A, mà khi được áp dụng cho các Fab, có thể tạo ra protein liên kết đặc hiệu kép hóa trị ba chứa hai đoạn Fab giống nhau liên kết với một đoạn Fab khác; hoặc (5) phân tử được gọi là Bọ cạp (Scorpion), chứa, ví dụ, hai scFv được dung hợp với cả hai đầu cùng của vùng Fc người. Ví dụ về các nền hữu ích để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm BiTE (Micromet), DART (MacroGenics), Fcab và Mab2 (F-star), IgG1 được thao tác di truyền Fc (Xencor) hoặc DuoBody (dựa trên sự trao đổi nhánh Fab, Genmab).

Thuật ngữ “epitop” dùng để chỉ vị trí trên kháng nguyên mà kháng thể liên kết vào đó. Epitop có thể được tạo ra từ các axit amin liên kề hoặc các axit amin không liên kề được đặt cạnh nhau do sự gấp bậc ba của một hoặc nhiều protein. Các epitop được tạo ra từ các axit amin liên kề (còn được biết là epitop tuyến tính) thường vẫn giữ lại được khi tiếp xúc với các dung môi làm biến tính trong khi các epitop được tạo ra do sự gấp bậc ba (còn được biết là epitop cấu hình) thường bị mất đi khi xử lý bằng các dung môi làm biến tính. Epitop thường chứa ít nhất là 3, và phổ biến hơn, ít nhất là 5 hoặc 8-10 axit amin trong cấu hình không gian duy nhất. Các phương pháp xác định cấu hình không gian của epitop bao gồm, ví dụ, phương pháp tinh thể học tia x và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. *Xem, ví dụ, Epitope Mapping Protocols, in Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996).* Epitop này có thể là tuyến tính, chẳng hạn như epitop chứa, ví dụ, 2-5, 3-5, 3-9, hoặc 5-9 axit amin liên kề từ SEQ ID NO:26, bao gồm, ví dụ, hai hoặc nhiều axit amin liên kề nằm trong các gốc 101-109 của vùng trưởng thành của SEQ ID NO:26. Epitop này cũng có thể là epitop cấu hình bao gồm, ví dụ, hai hoặc nhiều đoạn axit amin không liên kề nằm trong các gốc 101-109 của vùng trưởng thành của SEQ ID NO:26. Nếu một kháng thể được cho là liên kết với epitop bên trong các gốc axit amin 101-109 của transthyretin (TTR) (vùng trưởng thành của SEQ ID NO:26), ví dụ, điều đó có nghĩa là epitop này nằm trong khoảng các axit amin đã đề cập bao gồm cả các axit amin xác định giới hạn ngoài của khoảng này. Điều này không nhất thiết có nghĩa là mọi axit amin nằm

trong khoảng này đều tạo thành một phần của epitop này. Do đó, ví dụ, epitop nằm trong các gốc axit amin 101- 109 của TTR có thể chứa các axit amin 101-109, 101-108, 102-109, 101-107, 102-108, 103-109, 101-106, 102-107, 103-108, 104-109, 101-105, 102-106, 103-107, 104-108, 105-109, 101-104, 102-105, 103-106, 104-107, 105-108, 106-109, 101-103, 102-104, 103-105, 104-106, 105-107, 106-108, 107-109, 101-102, 102-103, 103-104, 104-105, 105-106, 106-107, 107-108, hoặc 108-109 của SEQ ID NO:26, trong số các đoạn tuyến tính khác của SEQ ID NO:30, hoặc trong trường hợp của epitop cấu hình, các đoạn axit amin không liên kề của SEQ ID NO:30.

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

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

Thuật ngữ “tự nhiên” đối với cấu trúc transthyretin (TTR) dùng để chỉ cấu trúc được

gấp bình thường của TTR ở trạng thái hoạt động đúng của nó (*nghĩa là*, tetrame TTR). Vì TTR là tetrame ở dạng được gấp tự nhiên của nó, dạng không tự nhiên của TTR bao gồm, ví dụ, tetrame TTR bị gấp sai, các monome TTR, các dạng kết tụ của TTR, và các dạng sợi của TTR. Các dạng không tự nhiên của TTR có thể bao gồm các phân tử chứa các trình tự axit amin TTR kiểu hoang hoặc các đột biến.

Thuật ngữ “bị gấp sai” đối với TTR dùng để chỉ cấu trúc bậc hai và bậc ba của monome và multimer polypeptit TTR, và chỉ ra là polypeptit này có cấu hình không bình thường đối với protein đó ở trạng thái hoạt động đúng của nó. Mặc dù sự gấp sai TTR có thể là do các đột biến trong protein này (*ví dụ*, đột biến mất đoạn, thay thế hoặc bổ sung), các protein TTR kiểu hoang cũng có thể bị gấp sai trong các bệnh, làm bộc lộ epitop đặc hiệu.

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

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

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

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

Thuật ngữ “mẫu đối chứng” dùng để chỉ mẫu sinh học chưa được biết hoặc bị nghi ngờ chứa các dạng monome, bị gấp sai, kết tụ, hoặc dạng sợi của transthyretin (TTR), chẳng hạn như trong các lắng đọng dạng tinh bột TTR. Các mẫu đối chứng có thể thu được từ các cá thể không bị mắc chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR hoặc loại được chọn cụ thể của chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR. Theo cách khác, các mẫu đối chứng có thể thu được từ các bệnh nhân bị mắc chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR hoặc loại được chọn cụ thể của chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR. Các mẫu này có thể thu được cùng lúc với mẫu sinh học được cho là có chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR hoặc vào thời điểm khác. Mẫu sinh học và mẫu đối chứng có thể thu được từ cùng một mô (ví dụ, phần mô chứa cả lắng đọng dạng tinh bột TTR và mô bình thường xung quanh). Tốt hơn, nếu các mẫu đối chứng chứa chủ yếu hoặc toàn bộ mô không có các lắng đọng dạng tinh bột TTR và có thể được sử dụng để so sánh với mẫu sinh học được cho là chứa các lắng đọng dạng tinh bột TTR. Tốt hơn, nếu mô trong mẫu đối chứng thuộc cùng một loại với mô trong mẫu sinh học (ví dụ, tế bào cơ tim trong tim).

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

Thuật ngữ “triệu chứng” dùng để chỉ bằng chứng chủ quan của bệnh, chẳng hạn như đáng đi thay đổi, như được nhận thức bởi người bệnh. “Dấu hiệu” dùng để chỉ bằng chứng khách quan của bệnh như được quan sát bởi bác sĩ.

Với mục đích phân loại các đột biến thể axit amin thành bảo thủ hoặc không bảo thủ, các axit amin được phân nhóm như sau: Nhóm I (chuỗi bên kỵ nước): met, ala, val, leu, ile; Nhóm II (chuỗi bên ưa nước trung tính): cys, ser, thr; Nhóm III (chuỗi bên axit hóa): asp, glu; Nhóm IV (chuỗi bên bazơ): asn, gln, his, lys, arg; Nhóm V (các gốc ảnh hưởng đến sự định hướng của chuỗi): gly, pro; và Nhóm VI (chuỗi bên thơm): trp, tyr, phe. Đột biến thể bảo thủ bao gồm các đột biến thể giữa các axit amin trong cùng một lớp. Đột biến thể không bảo thủ là sự thay thế một thành viên thuộc một trong số các lớp này với một thành viên thuộc lớp khác.

Tỉ lệ phần trăm tương đồng trình tự được xác định với các trình tự kháng thể được

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

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

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

Trừ khi có quy định khác, thuật ngữ “khoảng” bao gồm các giá trị nằm trong biên sai số chuẩn của phép đo (ví dụ, SEM) của giá trị đã cho.

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

Kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời với liệu pháp điều trị khác cho cùng một chỉ định với kháng thể này, nghĩa là liệu pháp điều trị khác này được sử dụng ít nhất một lần trong khoảng thời gian mà kháng thể này được sử dụng, khoảng thời gian này bắt đầu từ một tháng trước khi dùng liều thứ nhất và kết thúc vào một tháng sau khi dùng liều cuối cùng của kháng thể này. Liệu pháp điều trị khác này có thể được sử dụng cách nhau các khoảng cách thời gian định kỳ trong suốt khoảng thời gian này, mà có thể là giống hoặc không giống với các khoảng cách thời gian mà kháng thể này được sử dụng. Liệu pháp điều trị khác có thể là liệu pháp điều trị triệu chứng.

Liệu pháp điều trị triệu chứng nghĩa là nó chỉ tác động lên một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh, không phải nguyên nhân của bệnh, nghĩa là căn nguyên của bệnh.

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

hợp chất” có thể bao gồm nhiều hợp chất, bao gồm các hỗn hợp của chúng.

Trừ khi ngữ cảnh quy định khác một cách rõ ràng, khi phần mô tả bộc lộ là sản phẩm hoặc phương pháp chứa một dấu hiệu nhất định hoặc tổ hợp của các dấu hiệu, phần mô tả này nên được hiểu là bộc lộ theo cách khác sản phẩm hoặc phương pháp chứa hoặc chủ yếu chứa dấu hiệu này hoặc tổ hợp các dấu hiệu này.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Tổng quan

Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết đặc hiệu với các gốc 101-109 của transthyretin (TTR). Một số kháng thể liên kết với bất kỳ hoặc toàn bộ trong số các dạng monome, bị gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR ưu tiên hơn so với dạng tetrame tự nhiên của TTR. Một số kháng thể liên kết với một trong hai hoặc cả hai dạng monome hoặc bị gấp sai của TTR ưu tiên hơn so với dạng tetrame tự nhiên của TTR. Các kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tích tụ TTR hoặc tích tụ các lắng đọng TTR (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR). Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR. Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để chứng minh tác dụng dược lý của liệu pháp điều trị bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, trong số các ứng dụng khác. Liên kết ưu tiên hơn nghĩa là hằng số liên kết cao hơn ít nhất là năm lần đối với bất kỳ hoặc toàn bộ trong số các dạng monome, bị gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR so với dạng tetrame tự nhiên của TTR. Tùy ý, hằng số liên kết cao hơn ít nhất là mười lần đối với bất kỳ hoặc toàn bộ trong số các dạng monome, bị gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR so với dạng tetrame tự nhiên của TTR. Tùy ý, kháng thể này, như 18C5, ví dụ, thiếu khả năng liên kết đặc hiệu với dạng tetrame tự nhiên của TTR.

II. Các phân tử đích

Transthyretin (TTR) là protein vận chuyển dịch não tủy và huyết thanh, gồm 127 axit amin, 55 kDa được tổng hợp chủ yếu bởi gan. Nó còn được gọi là tiền albumin, tiền albumin liên kết thyroxin, ATTR, và TBPA. Ở trạng thái tự nhiên của nó, TTR tồn tại dưới dạng tetrame. Trong các thể đồng hợp tử, các tetrame này bao gồm các tiểu đơn vị giàu phiến beta 127 axit amin giống nhau. Trong các thể dị hợp tử, các tetrame TTR được tạo

bởi các tiểu đơn vị biến đổi và/hoặc kiểu hoang, thường được kết hợp theo kiểu thống kê.

Chức năng đã được xác định của TTR trong máu là vận chuyển protein liên kết *holo*-retinol. Mặc dù TTR là chất vận chuyển chính của thyroxin (T₄) trong máu của động vật gặm nhấm, bằng cách sử dụng các vị trí liên kết vuông góc với các vị trí được sử dụng cho protein liên kết *holo*-retinol, các vị trí liên kết T₄ không bị chiếm hữu hiệu ở người.

TTR là một trong số ít nhất là ba mươi protein người khác nhau mà có sự gấp nhầm và/hoặc lắp ráp nhầm ngoại bào (sự tạo dạng tinh bột) thành một loạt các cấu trúc kết tụ được cho là gây ra các bệnh thoái hóa được gọi là bệnh thoái hóa dạng tinh bột. TTR trải qua các thay đổi cấu hình để tạo dạng tinh bột. Sự phân ly của tetrame TTR và sự không gấp một phần làm bộc lộ các đoạn đuôi chứa các gốc kỵ nước không tích điện lớn ở cấu trúc kéo dài mà có thể lắp ráp nhầm hữu hiệu thành các khối kết tụ hình cầu phi cấu trúc lớn mà cuối cùng trải qua sự biến đổi cấu hình thành các cấu trúc dạng tinh bột phiên beta chéo.

Trừ khi được quy định theo cách khác, việc đề cập đến transthyretin (TTR) hoặc các đoạn hoặc vùng chức năng của nó bao gồm các trình tự axit amin người tự nhiên bao gồm các dạng đồng phân, đột biến và các biến thể alen của chúng. Các trình tự polypeptit TTR được lấy làm ví dụ được ký hiệu bằng các số truy cập P02766.1 (UniProt) (SEQ ID NO:26), AAB35639.1 (GenBank) (SEQ ID NO:27), AAB35640.1 (GenBank) (SEQ ID NO:28), và ABI63351.1 (GenBank) (SEQ ID NO:29). Các gốc được đánh số theo Swiss Prot P02766.1, với axit amin đầu tiên của protein trưởng thành (nghĩa là, không bao gồm trình tự tín hiệu 20 axit amin) được ký hiệu là gốc 1. Trong protein TTR khác bất kỳ, các gốc được đánh số theo các gốc tương ứng trong P02766.1 trên sự sắp xếp thẳng hàng tối đa.

III. Bệnh thoái hóa dạng tinh bột transthyretin

Bệnh thoái hóa dạng tinh bột transthyretin (TTR) là rối loạn toàn thân được đặc trưng bởi TTR bị gấp sai, gây bệnh và sự lắng đọng ngoại bào của các sợi dạng tinh bột được tạo thành từ TTR. Bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR thường bị gây ra bởi sự mất ổn định của dạng tetrame TTR tự nhiên (do các điều kiện môi trường hoặc di truyền), dẫn đến sự phân ly, gấp sai, và sự tích tụ TTR thành các sợi dạng tinh bột tích lũy trong nhiều cơ quan và mô khác nhau gây ra rối loạn nặng dần. Xem, ví dụ, Almeida và Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Ando và đồng tác giả, *Orphanet Journal of Rare Diseases*

8:31 (2013).

Ở người, tetrame TTR kiểu hoang và tetrame hỗn hợp tạo bởi các tiểu đơn vị đột biến và kiểu hoang đều có thể phân ly, gấp sai, và kết tụ với quá trình tạo dạng tinh bột dẫn đến sự thoái hóa mô bị tác động. Do đó, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR bao gồm các bệnh bị gây ra bởi TTR gấp sai gây bệnh do các đột biến trong TTR hoặc do TTR gấp sai, không đột biến.

Ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột ATTR kiểu hoang (còn gọi là bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già SSA) và bệnh thoái hóa dạng tinh bột tim do tuổi già (SCA) là loại liên quan đến tuổi của bệnh thoái hóa dạng tinh bột do sự lắng đọng của dạng tinh bột TTR kiểu hoang ngoài và trong tế bào cơ tim của tim. Bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR còn là dạng phổ biến nhất của bệnh thoái hóa dạng tinh bột di truyền (có tính gia đình), mà bị gây ra bởi các đột biến làm mất ổn định protein TTR. Bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR liên quan đến các đột biến điểm trong gen TTR bao gồm bệnh viêm đa dây thần kinh do dạng tinh bột có tính gia đình (FAP), bệnh cơ tim dạng tinh bột có tính gia đình (FAC), và bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (CNSA) hiếm gặp. Các bệnh nhân mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR di truyền (có tính gia đình) gần như luôn luôn là thể dị hợp, nghĩa là các tetrame TTR tạo bởi các tiểu đơn vị TTR đột biến và/hoặc kiểu hoang, thường được phân bố thống kê. Các dạng di truyền (có tính gia đình) của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR thường là di truyền theo gen trội và thường phát bệnh sớm hơn so với các bệnh đơn phát (SSA và SCA).

Có hơn 100 đột biến trong gen mã hóa TTR liên quan đến các rối loạn di truyền theo gen trội FAP và FAC. Xem, ví dụ, US 2014/0056904; Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas và Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet và Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983). Các đột biến gây ra dạng tinh bột này được phân bố trong toàn bộ phân tử TTR. Nói chung, các tiểu đơn vị đột biến gây mất ổn định cấu trúc tetrame TTR càng nhiều, bệnh thoái hóa dạng tinh bột càng xuất hiện sớm. Khả năng gây bệnh của biến thể TTR thường được quyết định bởi sự kết hợp của tình trạng mất ổn định và hiệu quả tiết trong tế bào của nó. Bệnh lý ban đầu bị gây ra bởi một số biến thể TTR xuất phát từ sự phá hủy chọn lọc mô tim của chúng, trong khi đó bệnh lý do các biến thể TTR khác đến từ việc gây tổn thương hệ thần kinh ngoại biên và thực vật. Sự tổn thương

mô do tạo dạng tinh bột TTR dường như chủ yếu bắt nguồn từ sự gây độc tế bào của các khối kết tụ TTR nhỏ, có thể khuếch tán, mặc dù sự tích lũy dạng tinh bột ngoại bào có thể góp phần và gần như chắc chắn gây tổn thương cấu trúc cơ quan trong các giai đoạn muộn của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR.

Bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR biểu hiện thành nhiều dạng khác nhau, với sự biến đổi kiểu hình đáng kể giữa các cá thể và vị trí địa lý. Ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR có thể biểu hiện là bệnh lý thần kinh sợi trục vận động và thực vật cảm giác, tiền triển. Bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR cũng có thể biểu hiện như là bệnh cơ tim thâm nhiễm.

Độ tuổi bắt đầu có các triệu chứng liên quan đến bệnh thay đổi từ hai mươi đến chín mươi, với các thay đổi lớn giữa các quần thể khác nhau. Sự liên quan đa hệ thống của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR là bằng chứng để chẩn đoán nó. Ví dụ, chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR được cân nhắc khi một hoặc vài yếu tố sau đây có mặt: (1) tiền sử gia đình mắc bệnh thần kinh, đặc biệt là liên quan đến bệnh suy tim; (2) bệnh đau thần kinh hoặc các rối loạn cảm giác tiền triển có nguyên nhân chưa rõ; (3) hội chứng ống cổ tay không có nguyên nhân rõ ràng, đặc biệt là nếu nó ở cả hai bên và đòi hỏi phải phẫu thuật; (4) các rối loạn vận động dạ dày ruột hoặc rối loạn thần kinh thực vật có nguyên nhân chưa rõ (ví dụ, rối loạn cương cứng, tụt huyết áp tư thế đứng, hội chứng bàng quang do bệnh thần kinh); (5) bệnh tim được đặc trưng bởi thành tâm thất bị dày lên mà không tăng huyết áp; (6) chèn nhĩ thất tiền triển có nguyên nhân chưa rõ, đặc biệt là khi kèm theo tim bị dày lên; và (7) thể vùi trong dịch thủy tinh kiểu bông-len. Xem Ando và đồng tác giả, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Các triệu chứng khác có thể bao gồm, ví dụ, bệnh đa dây thần kinh, mất cảm giác, đau, yếu các chi dưới, rối loạn tiết mồ hôi, bệnh tiêu chảy, chứng táo bón, sụt cân, và bệnh són tiểu/bí tiểu.

Việc chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR thường dựa trên các mẫu sinh thiết cơ quan đích, sau đó bằng cách nhuộm mô đã cắt ra bằng thuốc nhuộm đặc hiệu với tinh bột, đồ Congo. Nếu xét nghiệm dương tính với tinh bột được quan sát thấy, việc nhuộm hóa học mô miễn dịch và kỹ thuật xác định bằng phương pháp khối phổ đối với TTR được thực hiện tiếp để đảm bảo là protein tiền chất chịu trách nhiệm về sự tạo tinh bột thực sự là TTR. Các kháng thể được bộc lộ ở đây là hữu ích trong việc phân biệt bệnh thoái hóa

dạng tinh bột TTR với bệnh thoái hóa dạng tinh bột không phải TTR ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột thể chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (AL), còn được biết là bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân nguyên phát. Đối với các dạng di truyền của bệnh này, việc chứng minh đột biến trong gen mã hóa TTR sau đó là cần thiết trước khi thực hiện chẩn đoán. Việc này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng kỹ thuật điện di tập trung điểm đẳng điện, phản ứng chuỗi polymeraza, hoặc cắt laze/sắc ký lỏng khối phổ hai lần. Xem, ví dụ, US 2014/0056904; Ruberg và Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Ando và đồng tác giả, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013).

IV. Kháng thể

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

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết với protein transthyretin (TTR), cụ thể hơn, với các epitop nằm trong các gốc axit amin 101-109 (SEQ ID NO:30) của TTR. Các epitop này bị vùi trong tetrame TTR tự nhiên và được bộc lộ ở các dạng monome, bị gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR.

Một kháng thể như vậy là 18C5 và dạng khảm, được nguy trang và được làm tương thích với người của nó. Kháng thể này liên kết đặc hiệu bên trong các gốc axit amin 101-109 (SEQ ID NO: 30) của TTR. Kháng thể này còn được đặc trưng bởi có khả năng liên kết với dạng monome, bị gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR nhưng không liên kết với các dạng tetrame tự nhiên của TTR. Khả năng liên kết với các protein đặc hiệu hoặc các đoạn của nó có thể được chứng minh bằng cách sử dụng các kiểu thử nghiệm điển hình được cung cấp trong phần ví dụ thực hiện sáng chế. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 18C5 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng khảm, được nguy trang hoặc dạng được làm tương thích với người của chuột. Dòng tế bào lai mà sản sinh kháng thể đơn dòng 18C5 được lưu trữ với Lưu ký Patent của Bộ sưu tập chủng nuôi cấy kiểu Mỹ (American Type Culture Collection: ATCC), Manassas, Virginia, 20110-2209 vào ngày 31 tháng 10, 2017 và được gán số lưu trữ Patent PTA-124570.

Một số kháng thể liên kết với cùng một epitop hoặc epitop chồng lặp với kháng thể được ký hiệu là 18C5. Các trình tự của vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ của 18C5 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 1 và 3, tương ứng. Các kháng thể khác có tính đặc hiệu liên kết như vậy có thể được sản sinh bằng cách gây miễn dịch cho chuột bằng

TTR, hoặc một phần của nó chứa epitop mong muốn (ví dụ, SEQ ID NO:30), và sàng lọc các kháng thể tạo thành về khả năng liên kết với TTR monome hoặc peptit chứa SEQ ID NO:30, tùy ý cạnh tranh với kháng thể có các vùng biến đổi của 18C5 của chuột (IgG1, kappa). Các đoạn của TTR chứa epitop mong muốn có thể được liên kết với chất mang giúp gây ra đáp ứng kháng thể với đoạn này và/hoặc được kết hợp với tá được giúp gây ra đáp ứng này. Các kháng thể này có thể được sàng lọc về khả năng liên kết phân biệt với các dạng monome, kiểu hoang của TTR hoặc một đoạn của nó (ví dụ, SEQ ID NO:26) so với các đột biến của các gốc xác định. Việc sàng lọc dựa trên các đột biến này xác định chính xác hơn tính đặc hiệu liên kết để cho phép nhận diện các kháng thể có khả năng liên kết bị ức chế bởi sự gây đột biến các gốc cụ thể và các kháng thể có thể có chung các đặc điểm chức năng với các kháng thể điển hình khác. Các đột biến này có thể là đột biến thế thay thế hệ thống bằng alanin (hoặc serin hoặc glyxin nếu alanin đã có sẵn) một gốc một lần, hoặc các khoảng cách nhau rộng hơn, trên toàn bộ đích này hoặc toàn bộ một phần của nó trong đó được biết là có epitop này. Nếu cùng một tập hợp các đột biến làm giảm đáng kể khả năng liên kết của hai kháng thể, hai kháng thể này liên kết với cùng một epitop.

Các kháng thể có tính đặc hiệu liên kết của kháng thể chuột đã chọn (ví dụ, 18C5) cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng biến thể của phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Xem Winter, WO 92/20791. Phương pháp này là đặc biệt thích hợp để tạo ra các kháng thể người. Trong phương pháp này, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể chuột đã chọn được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu. Nếu, ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn làm nguyên liệu khởi đầu, thư viện thể thực khuẩn được xây dựng trong đó các thành viên biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nhẹ (*nghĩa là*, nguyên liệu khởi đầu của chuột) và vùng biến đổi chuỗi nặng khác. Vùng biến đổi chuỗi nặng này có thể, ví dụ, thu được từ thư viện vùng biến đổi chuỗi nặng của người được sắp xếp lại. Thể thực khuẩn thể hiện khả năng liên kết đặc hiệu mạnh (ví dụ, ít nhất là 10^8 và tốt hơn, nếu ít nhất là 10^9 M^{-1}) đối với TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 101-109) được lựa chọn. Sau đó vùng biến đổi chuỗi nặng từ thể thực khuẩn này đóng vai trò là nguyên liệu khởi đầu để xây dựng thư viện thể thực khuẩn khác nữa. Trong thư viện này, mỗi thể thực khuẩn biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nặng (*nghĩa là*, vùng được xác định từ thư viện biểu hiện thứ nhất) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác. Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ này có thể thu được, ví dụ, từ thư viện của các vùng chuỗi nhẹ biến đổi của người được sắp

xếp lại. Một lần nữa, thể thực khuẩn thể hiện khả năng liên kết đặc hiệu mạnh với TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 101-109) được lựa chọn. Các kháng thể tạo thành thường có cùng tính đặc hiệu epitop hoặc tính đặc hiệu epitop tương tự với nguyên liệu khởi đầu của chuỗi.

Các kháng thể khác có thể thu được bằng kỹ thuật gây đột biến cADN mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể điển hình, chẳng hạn như 18C5. Các kháng thể đơn dòng mà tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 18C5 về trình tự axit amin của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng trưởng thành và duy trì các đặc điểm chức năng của nó, và/hoặc khác với kháng thể tương ứng bởi một số lượng nhỏ các đột biến thể (ví dụ, các đột biến thể bảo tồn), các đột biến mất đoạn, hoặc các đột biến gắn xen axit amin không quan trọng về mặt chức năng cũng được bao gồm trong sáng chế. Các kháng thể đơn dòng có ít nhất là một hoặc toàn bộ sáu CDR như được xác định bằng định nghĩa thông thường, nhưng tốt hơn nếu là Kabat, mà tương đồng 90%, 95%, 99% hoặc 100% với các CDR tương ứng của 18C5 cũng được bao gồm.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể có một số hoặc toàn bộ (ví dụ, 3, 4, 5, và 6) CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ 18C5. Các kháng thể này có thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà có ít nhất là hai, và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ vùng biến đổi chuỗi nặng của 18C5 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ có ít nhất là hai, và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 18C5. Các kháng thể này có thể bao gồm cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. CDR chủ yếu là từ CDR 18C5 tương ứng khi nó chứa không nhiều hơn 4, 3, 2, hoặc 1 đột biến thể, đột biến gắn xen hoặc đột biến mất đoạn, ngoại trừ CDR-H2 (khi được xác định bởi Kabat) có thể có không nhiều hơn 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 đột biến thể, đột biến gắn xen hoặc đột biến mất đoạn. Các kháng thể này có thể có sự tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 18C5 về trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc nhẹ trưởng thành và duy trì được các đặc điểm chức năng của chúng, và/hoặc khác biệt với 18C5 ở một số lượng nhỏ các đột biến thay thế (ví dụ, đột biến thể bảo tồn), đột biến mất đoạn, hoặc đột biến gắn xen axit amin không quan trọng về chức năng.

Các CDR tổ hợp Kabat/Chothia (CDR-H1, CDR-H2, CDR-H3) của chuỗi nặng của 18C5 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 5, 7, và 9, và các CDR liên hợp Kabat/Chothia

(CDR-L1, CDR-L2, CDR-L3) của chuỗi nhẹ của 18C5 lần lượt được ký hiệu là SEQ ID NO: 11, 13, và 15.

Bảng 2 chỉ ra các CDR 18C5 như được xác định bằng Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat (còn được gọi ở đây là “Tổ hợp Kabat/Chothia”), AbM, và Contact.

Bảng 2

Các CDR 18C5 như được xác định bởi Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat, AbM, và Contact, sử dụng cách đánh số Kabat

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp của Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO: 11	L24--L34 SEQ ID NO: 11	L24--L34 SEQ ID NO: 11	L24--L34 SEQ ID NO: 11	L30--L36 SEQ ID NO: 100
L2	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L50--L56 SEQ ID NO: 13	L46--L55 SEQ ID NO: 101
L3	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L97 SEQ ID NO: 15	L89--L96 SEQ ID NO: 102
H1	H31--H35B SEQ ID NO: 93	H26--H32 SEQ ID NO: 94	H26--H35B SEQ ID NO: 5	H26--H35B SEQ ID NO: 5	H30--H35B SEQ ID NO: 95
H2	H50--H65 SEQ ID NO: 7	H52--H56 SEQ ID NO: 96	H50--H65 SEQ ID NO: 7	H50--H58 SEQ ID NO: 97	H47--H58 SEQ ID NO: 98
H3	H95--H102 SEQ ID NO: 9	H95--H102 SEQ ID NO: 9	H95--H102 SEQ ID NO: 9	H95--H102 SEQ ID NO: 9	H93--H101 SEQ ID NO: 99

Một số kháng thể được nhận diện bởi các thử nghiệm này có thể liên kết với dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR nhưng không liên kết với dạng tetramer tự nhiên của TTR, như được mô tả trong các ví dụ hoặc phần khác. Tương tự, một số kháng thể phản ứng miễn dịch trên mô bị thoái hóa dạng tinh bột do TTR nhưng không phản ứng miễn dịch trên mô khỏe mạnh.

Một số kháng thể có thể ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ TTR, ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR, làm giảm hoặc đào thải các lắng đọng TTR hoặc TTR bị kết tụ, hoặc làm

ổn định các cấu hình không độc của TTR ở mô hình động vật hoặc thử nghiệm lâm sàng. Một số kháng thể có thể điều trị, phòng ngừa hoặc làm chậm sự phát bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR như được thể hiện trong mô hình động vật hoặc thử nghiệm lâm sàng. Các mô hình động vật điển hình để thử nghiệm tác dụng chống lại bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR bao gồm các mô hình được mô tả trong Kohno và đồng tác giả, *Am. J. Path.* 150(4): 1497-1508 (1997); Teng và đồng tác giả, *Laboratory Investigations* 81:385-396 (2001); Wakasugi và đồng tác giả, *Proc. Japan Acad.* 63B:344-347 (1987); Shimada và đồng tác giả, *Mol. Biol. Med.* 6:333-343 (1989); Nagata và đồng tác giả, *J. Biochem.* 117:169-175 (1995); Sousa và đồng tác giả, *Am. J. Path.* 161:1935-1948 (2002); và Santos và đồng tác giả, *Neurobiology of Aging* 31:280-289 (2010).

Kháng thể liên kết với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR có thể được xác định bằng cách gây miễn dịch cho động vật bằng TTR hoặc một đoạn của nó và sàng lọc kháng thể đã cảm ứng được để xác định kháng thể liên kết trong các gốc 101-109 của TTR. Động vật này có thể là, ví dụ, động vật gặm nhấm, như chuột nhắt, thỏ hoặc chuột cống. Động vật này có thể là chuyển gen, như động vật gặm nhấm được biến đổi để có gen globulin miễn dịch người. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể là đoạn chứa không quá 25 gốc liên kề của TTR bao gồm ít nhất là 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 gốc liên kề nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể bao gồm các gốc 101-109 của TTR. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể được liên kết với chất mang để giúp tăng cường tạo ra kháng thể. Kháng thể này có thể được sàng lọc bằng cách xác định kháng thể có liên kết với đoạn TTR chứa các gốc 101-109 hay không. Tùy ý, kháng thể này cũng có thể được sàng lọc về khả năng liên kết với TTR có độ dài đầy đủ.

Kháng thể liên kết với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR có thể được xác định bằng cách cung cấp thư viện biểu hiện của kháng thể, và sàng lọc thư viện biểu hiện này để xác định kháng thể liên kết trong các gốc 101-109 của TTR. Thư viện biểu hiện này có thể là thư viện biểu hiện thể thực khuẩn, thư viện biểu hiện nấm men, thư viện biểu hiện ribosom trong số các thư viện khác. Thư viện biểu hiện này có thể, ví dụ, biểu hiện các kháng thể dưới dạng các đoạn Fv hoặc Fab. Thư viện biểu hiện có thể là thư viện biểu hiện chưa từng tham gia thử nghiệm. Các phương pháp để phân lập kháng thể từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn được bộc lộ, ví dụ, trong WO 2017/207739. Theo cách khác, thư viện

biểu hiện này có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật gặm nhấm bằng TTR hoặc một đoạn của nó và tách dòng axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể vào vector biểu hiện. Động vật gặm nhấm này có thể là, ví dụ, chuột nhắt, thỏ hoặc chuột cống. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể là đoạn chứa không quá 25 gốc liên kề của TTR bao gồm ít nhất là 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 gốc liên kề nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể bao gồm các gốc 101-109 của TTR. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể được liên kết với chất mang để giúp tăng cường tạo ra kháng thể. Các thành viên thư viện có thể được sàng lọc về khả năng liên kết với đoạn TTR chứa các gốc 101-109. Tùy ý, các thành viên của thư viện cũng có thể được sàng lọc về khả năng liên kết với TTR có độ dài đầy đủ. Các thành viên thư viện có thể được sàng lọc khi có mặt kháng thể tham chiếu mà liên kết với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Kháng thể tham chiếu có thể là kháng thể 18C5.

Kháng thể thử nghiệm cạnh tranh liên kết với kháng thể 18C5 để liên kết với TTR có thể được xác định bằng cách cho TTR tiếp xúc với kháng thể thử nghiệm khi có mặt và vắng mặt kháng thể 18C5 và xác định khả năng liên kết của kháng thể này với TTR. Khả năng liên kết của kháng thể này khi có mặt kháng thể 18C5 bị giảm chỉ ra là kháng thể này cạnh tranh với kháng thể 18C5 để liên kết với TTR. Ngoài ra hoặc theo cách khác, thử nghiệm này có thể được thực hiện bằng cách cho TTR tiếp xúc với kháng thể 18C5 khi có mặt hoặc vắng mặt kháng thể thử nghiệm, trong trường hợp này khả năng liên kết của 18C5 với TTR bị giảm khi có mặt kháng thể thử nghiệm chỉ ra sự cạnh tranh.

Kháng thể liên kết với cùng một epitop với kháng thể 18C5 trên TTR có thể được xác định bằng cách xác định epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR, gây miễn dịch cho động vật bằng TTR hoặc một đoạn của nó, và sàng lọc kháng thể đã cảm ứng được để xác định kháng thể liên kết vào cùng một epitop với kháng thể 18C5. Động vật này có thể là, ví dụ, động vật gặm nhấm, như chuột nhắt, thỏ hoặc chuột cống. Động vật này có thể là chuyển gen, như động vật gặm nhấm được biến đổi để có gen globulin miễn dịch người.

Kháng thể liên kết với cùng một epitop với kháng thể 18C5 trên TTR có thể được xác định bằng cách xác định epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR, cung cấp thư viện biểu hiện của kháng thể, và sàng lọc thư viện biểu hiện này để xác định kháng thể

liên kết vào cùng một epitop với kháng thể 18C5. Thư viện biểu hiện này có thể là thư viện biểu hiện thể thực khuẩn, thư viện biểu hiện nấm men hoặc thư viện biểu hiện ribosom. Thư viện biểu hiện này có thể, ví dụ, biểu hiện các kháng thể dưới dạng các đoạn Fv hoặc đoạn Fab. Thư viện biểu hiện có thể là thư viện biểu hiện chưa từng tham gia thử nghiệm. Các phương pháp để phân lập kháng thể từ thư viện biểu hiện thể thực khuẩn được bộc lộ, ví dụ, trong WO 2017/207739.

Các kháng thể cũng có thể được sản sinh bằng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn để có tính đặc hiệu liên kết của kháng thể chuột đã chọn (ví dụ, 18C5). Trong phương pháp này, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể chuột đã chọn được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu. Nếu, ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn làm nguyên liệu khởi đầu, thư viện thể thực khuẩn được xây dựng trong đó các thành viên biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nhẹ (nghĩa là, nguyên liệu khởi đầu của chuột) và vùng biến đổi chuỗi nặng khác. Vùng biến đổi chuỗi nặng này có thể, ví dụ, thu được từ thư viện vùng biến đổi chuỗi nặng của người được sắp xếp lại. Thể thực khuẩn thể hiện khả năng liên kết đặc hiệu mạnh (ví dụ, ít nhất là 10^8 và tốt hơn, nếu ít nhất là 10^9 M^{-1}) đối với TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 101-109) được lựa chọn. Sau đó vùng biến đổi chuỗi nặng từ thể thực khuẩn này đóng vai trò là nguyên liệu khởi đầu để xây dựng thư viện thể thực khuẩn khác nữa. Trong thư viện này, mỗi thể thực khuẩn biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nặng (nghĩa là, vùng được xác định từ thư viện biểu hiện thứ nhất) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác. Các vùng biến đổi chuỗi nhẹ này có thể thu được, ví dụ, từ thư viện của các vùng chuỗi nhẹ biến đổi của người được sắp xếp lại. Một lần nữa, thể thực khuẩn thể hiện khả năng liên kết đặc hiệu mạnh với TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 101-109) được lựa chọn. Các kháng thể tạo thành thường có cùng tính đặc hiệu epitop hoặc tính đặc hiệu epitop tương tự với nguyên liệu khởi đầu của chuột.

Thư viện biểu hiện để tạo ra kháng thể liên kết với cùng một epitop với kháng thể 18C5 trên TTR có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch động vật gặm nhấm bằng TTR hoặc một đoạn của nó và tách dòng axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể vào vectơ biểu hiện. Động vật gặm nhấm này có thể là, ví dụ, chuột nhắt, thỏ hoặc chuột cống. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể là đoạn chứa không quá 25 gốc liên kề của TTR bao gồm ít nhất là 3, 4, 5, 6, 7, 8 hoặc 9 gốc liên kề nằm trong các gốc 101-109

của TTR. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể bao gồm các gốc 101-109 của TTR. Đoạn được sử dụng để gây miễn dịch có thể được liên kết với chất mang để giúp tăng cường tạo ra kháng thể.

Các thành viên thư viện biểu hiện có thể được sàng lọc về khả năng liên kết với đoạn TTR chứa các gốc 101-109. Tùy ý, các thành viên của thư viện cũng có thể được sàng lọc về khả năng liên kết với TTR có độ dài đầy đủ. Các thành viên thư viện có thể được sàng lọc khi có mặt kháng thể tham chiếu mà liên kết với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Kháng thể tham chiếu có thể là kháng thể 18C5.

Epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR có thể được xác định, ví dụ, bằng cách đo khả năng liên kết của 18C5 với dạng monome, kiểu hoang, của TTR hoặc một đoạn của nó so với các đột biến của các gốc xác định. Các đột biến này có thể là đột biến thế thay thế hệ thống bằng alanin (hoặc serin hoặc glyxin nếu alanin đã có sẵn) một gốc một lần, hoặc các khoảng cách nhau rộng hơn, trên toàn bộ đích này hoặc toàn bộ một phần của nó trong đó được biết là có epitop này. Hai kháng thể có cùng epitop nếu tất cả các đột biến axit amin trong kháng nguyên mà làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của một kháng thể cũng làm giảm hoặc làm mất khả năng liên kết của kháng thể còn lại. Epitop được liên kết bởi kháng thể 18C5 trên TTR cũng có thể được xác định bằng kỹ thuật tinh thể học tia X của kháng thể đã liên kết với kháng nguyên của nó để xác định các gốc tiếp xúc. Hai kháng thể liên kết với cùng một epitop nếu chúng có cùng các gốc tiếp xúc.

Kháng thể kháng TTR liên kết với epitop TTR khác với epitop của 18C5, bao gồm các dạng khảm và được làm tương thích với người của chúng, là hữu ích trong các liệu pháp kết hợp, trong các kháng thể đặc hiệu kép, trong các phương pháp chẩn đoán và/hoặc điều trị các rối loạn liên quan đến TTR, và trong phương pháp phát hiện TTR, với các kháng thể 18C5 của sáng chế. Các kháng thể kháng TTR, mà liên kết với epitop TTR khác với epitop TTR của 18C5, có thể bao gồm các kháng thể như trong Bảng 3 dưới đây.

Bảng 3: Kháng thể kháng TTR.

Tên	Epitop trên TTR như đã báo cáo	VH/VL hoặc CDR như đã báo cáo	Tham chiếu
-----	-----------------------------------	----------------------------------	------------

9D5	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDR: CDR-H1 SEQIDNO:75 CDR-H2 SEQ ID NO:76 CDR-H3 SEQ ID NO:77 CDR-L1 SEQ ID NO:78 CDR-L2 SEQ ID NO:79	WO 2016/120810 A1 Số lưu trữ ATCC PTA- 124078 Ngày: 4 tháng 4, 2017
14G8	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDR CDR-H1 SEQ ID NO:39 CDR-H2 SEQ ID NO:40 CDR-H3 SEQ ID NO:41 CDR-L1 SEQIDNO:42 CDR-L2 SEQ ID NO:43	WO 2016/120810 A1 số lưu trữ ATCC PTA- 124079 Ngày: 4 tháng 4, 2017
5A1	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDR CDR-H1 SEQ ID NO:46 CDR-H2 SEQ ID NO:47 CDR-H3 SEQ ID NO:48 CDR-L1 SEQ ID NO 49 CDR-L2 SEQ ID NO :50 CDR-L3 SEQ ID NO: 51	WO 2016/120811 số lưu trữ ATCC PTA-124080 Ngày: 4 tháng 4, 2017
6C1	EHAEEVFTA (89-97) (SEQ ID NO:45)	Kabat CDR CDR-H1 SEQ ID NO:52 CDR-H2 SEQ ID NO:53 CDR-H3 SEQ ID NO: 54 CDR-L1 SEQ ID NO: 55 CDR-L2 SEQ ID NO:56 CDR-L3 SEQ ID NO: 57	WO 2016/120809 số lưu trữ ATCC PTA-124077 Ngày: 4 tháng 4, 2017
AD7F6		VH SEQ ID NO: 58 VL SEQ ID NO: 59	WO 2010/030203 A1

RT24	118-122, 115-124	CDR-H1 SEQ ID NO:60 CDR-H2 SEQ ID NO:61 CDR-H3 SEQ ID NO: 62 CDR-L1 SEQ ID NO: 63 CDR-L2 SEQ ID NO: 64 CDR-L3 SEQ ID NO: 65	WO 2015/115331
NI-301.35G11	53-63, 54-61	CDR-H1 SEQ ID NO: 66 CDR-H2 SEQ ID NO: 67 CDR-H3 SEQ ID NO:68 CDR-L1 SEQ ID NO: 69 CDR-L2 SEQ ID NO: 70 CDR-L3 SEQ ID NO:71	US 2016/0355576 AI
MFD101, MDF102, MFD103,	ADDTWEPFASGKT (các gốc 36-49) (SEQ ID NO: 72)		US 2016/0039916 AI
MFD107, MFD108, MFD109,	TSESGELHGLTTE (các gốc 49-61) (SEQ ID NO:73)		US 2016/0039916 AI
MFD114	ALLSPYSYSTTAV (các gốc 109-121) (SEQ		US 2016/0039916 AI
	30-66		US 2016/0039916
	70-127		US 2016/0039916
	80-127		US 2016/0039916
	90-127		US 2016/0039916
	100-127		US 2016/0039916
	110-127		US 2016/0039916
	115-127		US 2016/0039916

B. Các kháng thể không phải của người

Sự tạo thành các kháng thể không phải của người khác, ví dụ, chuột, chuột lang, linh trưởng, thỏ hoặc chuột cống kháng lại TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các

gốc axit amin 101-109) có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, gây miễn dịch động vật này với TTR hoặc một đoạn của nó. Xem Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (được đưa vào bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích). Các kháng nguyên này có thể thu được từ nguồn tự nhiên, bằng cách tổng hợp peptit, hoặc biểu hiện tái tổ hợp. Tùy ý, kháng nguyên này có thể được sử dụng bằng cách được dung hợp hoặc tạo phức với protein mang. Tùy ý, kháng nguyên này có thể được sử dụng với tá được. Một số loại tá được có thể được sử dụng như được mô tả dưới đây. Tá được Freund hoàn chỉnh sau đó là tá được không hoàn chỉnh được ưu tiên hơn để gây miễn dịch cho động vật thí nghiệm. Thỏ hoặc chuột lang thường được sử dụng để tạo ra các kháng thể đa dòng. Chuột thường được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng. Các kháng thể được sàng lọc về khả năng liên kết đặc hiệu với TTR monome hoặc epitop trong TTR (ví dụ, epitop chứa một hoặc nhiều trong số các gốc axit amin 101-109). Việc sàng lọc này có thể được thực hiện bằng cách xác định khả năng liên kết của kháng thể với tập hợp các biến thể TTR monome, chẳng hạn như các biến thể TTR chứa các gốc axit amin 101-109 hoặc các đột biến trong các gốc này, và xác định các biến thể TTR liên kết với kháng thể này. Khả năng liên kết có thể được đánh giá, ví dụ, bằng kỹ thuật thẩm tách Western, FACS hoặc ELISA.

C. Kháng thể được làm tương thích với người

Kháng thể được làm tương thích với người là kháng thể được thao tác di truyền trong đó các CDR từ kháng thể “cho” không phải của người được ghép vào các trình tự kháng thể “nhận” của người (xem, ví dụ, Queen, US 5,530,101 và 5,585,089; Winter, US 5,225,539; Carter, US 6,407,213; Adair, US 5,859,205; và Foote, US 6,881,557). Các trình tự kháng thể nhận có thể là, ví dụ, trình tự kháng thể người trưởng thành, tổ hợp của các trình tự này, trình tự liên ứng của các trình tự kháng thể người, hoặc trình tự vùng dòng phôi. Do đó, kháng thể được làm tương thích với người là kháng thể có ít nhất là ba, bốn, năm hoặc toàn bộ các CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ kháng thể cho và các trình tự khung vùng biến đổi và vùng hằng định, nếu có mặt, hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ các trình tự kháng thể người. Tương tự, chuỗi nặng được làm tương thích với người có ít nhất là một, hai và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ chuỗi nặng của kháng thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nặng, nếu có

mặt, chủ yếu là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng của người và vùng hằng định của người. Tương tự, chuỗi nhẹ được làm tương thích với người có ít nhất là một, hai và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ chuỗi nhẹ kháng thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nhẹ, nếu có mặt, chủ yếu là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ của người và vùng hằng định của người. Khác với các kháng thể nano và dAb, kháng thể được làm tương thích với người chứa chuỗi nặng được làm tương thích với người và chuỗi nhẹ được làm tương thích với người. CDR trong kháng thể được làm tương thích với người chủ yếu là từ CDR tương ứng trong kháng thể không phải của người khi ít nhất là 85%, 90%, 95% hoặc 100% các gốc tương ứng (như được xác định bởi định nghĩa thông thường bất kỳ nhưng tốt hơn nếu được xác định bằng Kabat) là giống nhau giữa các CDR tương ứng. Các trình tự khung vùng biến đổi của chuỗi kháng thể hoặc vùng hằng định của chuỗi kháng thể chủ yếu là từ trình tự khung vùng biến đổi của người hoặc vùng hằng định của người, tương ứng, khi ít nhất là 85%, 90%, 95% hoặc 100% các gốc tương ứng được xác định bằng định nghĩa thông thường bất kỳ nhưng tốt hơn nếu được xác định bởi Kabat là giống nhau. Để được phân loại là được làm tương thích với người theo định nghĩa về tên gốc quốc tế (INN) của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) 2014 về các kháng thể được làm tương thích với người, một kháng thể phải có sự tương đồng ít nhất là 85% trong vùng biến đổi trưởng thành với các trình tự kháng thể dòng mầm của người (nghĩa là, trước quá trình siêu đột biến thân). Các kháng thể hỗn hợp là các kháng thể mà một chuỗi kháng thể của nó (ví dụ, chuỗi nặng) phù hợp giới hạn nhưng chuỗi còn lại (ví dụ, chuỗi nhẹ) không phù hợp với giới hạn. Kháng thể được phân loại là khả năng nếu cả hai chuỗi đều không phù hợp với giới hạn, mặc dù các vùng khung biến đổi cho cả hai chuỗi đều gần như là của người với một số đột biến ngược của chuột. Xem, Jones và đồng tác giả (2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names, mAbs8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. Ngoài ra, xem “WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)” (Internet) 2014. Có trên: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Để tránh nghi ngờ, thuật ngữ “được làm tương thích với người” như được sử dụng ở đây không được dự định bị giới hạn vào định nghĩa INN của WHO năm 2014 về các kháng thể được làm tương thích với người. Một số kháng thể được làm tương thích với người được

đề xuất ở đây có tỉ lệ tương đồng trình tự ít nhất là 85% với trình tự dòng mầm của người trong một hoặc cả hai vùng biến đổi trưởng thành và một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỉ lệ tương đồng trình tự ít hơn 85% với trình tự dòng mầm của người trong một hoặc cả hai vùng biến đổi. Một số vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỉ lệ tương đồng trình tự từ khoảng 60% đến 100% với các trình tự dòng mầm của người, như, ví dụ, trong khoảng từ khoảng 60% đến 69%, 70% đến 79%, 80% đến 84%, hoặc 85% đến 89%. Một số vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành nằm trong định nghĩa INN của WHO 2014 và có, ví dụ, tỉ lệ tương đồng trình tự khoảng 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, hoặc 82%, 83%, hoặc 84% với các trình tự dòng mầm của người, trong khi các vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành khác thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 và có tỉ lệ tương đồng trình tự khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89% hoặc lớn hơn với các trình tự dòng mầm của người. Một số vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỉ lệ tương đồng trình tự từ khoảng 60% đến 100% với các trình tự dòng mầm của người, như, ví dụ, trong khoảng từ khoảng 80% đến 84%, hoặc 85% đến 89%. Một số vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành là theo định nghĩa INN của WHO 2014 và có, ví dụ, tỉ lệ tương đồng trình tự khoảng 81%, 82%, 83%, hoặc 84% với các trình tự dòng mầm của người, trong khi các vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành khác thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 và có tỉ lệ tương đồng trình tự khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89% hoặc lớn hơn với các trình tự dòng mầm của người. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây mà là "khảm" theo định nghĩa INN của WHO 2014 có các vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có tỉ lệ tương đồng ít hơn 85% với trình tự dòng mầm của người được bắt cặp với các vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có tỉ lệ tương đồng ít hơn 85% với các trình tự dòng mầm của người. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây là "hỗn hợp" theo định nghĩa INN của WHO 2014, ví dụ, có vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có tỉ lệ tương đồng trình tự ít nhất là 85% với các trình tự dòng mầm của người được bắt cặp với vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có tỉ lệ tương đồng trình tự ít hơn 85% với các trình tự dòng mầm của người, hoặc ngược lại. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 về "được làm tương thích với người" và có vùng biến đổi chuỗi nặng

trưởng thành có tỉ lệ tương đồng trình tự ít nhất là 85% với trình tự dòng mầm người được bắt cặp với vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có tỉ lệ tương đồng trình tự ít nhất là 85% với các trình tự dòng mầm của người. Các kháng thể 18C5 được lấy làm ví dụ thỏa mãn định nghĩa INN của WHO năm 2014 về "được làm tương thích với người" bao gồm các kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:85 hoặc SEQ ID NO: 86 được bắt cặp với vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:91 hoặc SEQ ID NO:92.

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

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

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

Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nặng 18C5 là Crenezumab Fab (CreneFab) VH được làm tương thích với người, với mã truy cập PDB 5VZY (SEQ ID NO:83). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ 18C5 là Crenezumab Fab (CreneFab) VL được làm tương thích với người, với mã truy cập PDB 5VZY (SEQ ID NO:89). Ví dụ khác về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ 18C5 là gen dòng mầm của người IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:90).

Nếu nhiều hơn một trình tự kháng thể nhận của người được chọn cho chuỗi (hoặc nhẹ hoặc nặng), tổ hợp hoặc thể lai của các kháng thể nhận có thể được sử dụng cho chuỗi đó, và các axit amin được sử dụng khác nhau có thể được lấy từ bất kỳ trong số các trình tự kháng thể nhận của người được sử dụng.

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

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

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

Sáng chế đề xuất các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 18C5 của

chuột bao gồm 2 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85), và hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)), và 2 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ (hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91) và hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)).

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

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

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

Các gốc khung khác mà là ứng viên cho sự thể là các gốc axit glutamic đầu cùng N (E) mà có thể được thay thế bằng glutamin (Q).

Các kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ là các dạng được làm tương thích với người của 18C5 của chuột, được ký hiệu là Hu18C5.

Kháng thể 18C5 của chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa lần lượt SEQ ID NO: 81 và SEQ ID NO:87. Sáng chế đề xuất 2 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: hu18C5-VH_v1 và hu18C5-VH_v2. Sáng chế đề xuất thêm 2 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ: hu18C5-VL_v1 và hu18C5-VL_v2. Sự sắp

xếp thẳng hàng kháng thể 18C5 của chuột và nhiều kháng thể được làm tương thích với người khác nhau được chỉ ra cho các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (Bảng 6 và Fig. 4), và các vùng biến đổi chuỗi nặng (Bảng 7 và Fig. 3).

Với các lý do như ảnh hưởng có thể trên cấu hình CDR và/hoặc khả năng liên kết với kháng nguyên, gây ra sự tương tác giữa các chuỗi nặng và nhẹ, tương tác với vùng hằng định, là vị trí biến đổi sau dịch mã mong muốn hoặc không mong muốn, là gốc bất thường về vị trí của nó trong trình tự vùng biến đổi của người và do đó có khả năng gây miễn dịch, có khả năng kết tụ, và các lý do khác, 8 vị trí khung vùng biến đổi sau đây của 18C5 được xem là ứng viên cho các đột biến thể trong 2 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ và 2 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người được lấy làm ví dụ, như được chỉ ra cụ thể hơn trong ví dụ 7: L2 (I2V), L45 (Q45R), H37 (V37A), H45 (L45Q), H47 (L47W), H48 (V48I), H49 (A49G), và H94 (S94R).

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

Các vùng CDR của các kháng thể được làm tương thích với người này có thể là giống hoặc gần như giống với các vùng CDR của kháng thể cho của chuột 18C5. Các vùng CDR này có thể được xác định theo định nghĩa thông thường bất kỳ, như trong Bảng 1, nhưng tốt hơn, nếu được xác định bởi Kabat hoặc tổ hợp Kabat+Chothia.

Các vị trí khung vùng biến đổi là theo cách đánh số Kabat trừ khi có quy định khác.

Khả năng biến đổi thêm trong các biến thể 18C5 được làm tương thích với người là các đột biến ngược bổ sung trong khung vùng biến đổi. Nhiều gốc khung không tiếp xúc với các CDR trong mAb được làm tương thích với người có thể chứa các đột biến thể của các axit amin từ các vị trí tương ứng của mAb cho của chuột hoặc các kháng thể của chuột hoặc người khác, và ngay cả nhiều gốc tiếp xúc với CDR tiềm năng cũng có thể bị thay thế. Ngay cả các axit amin nằm trong các CDR cũng có thể bị thay thế, ví dụ, bằng các gốc được tìm thấy ở các vị trí tương ứng của trình tự nhận của người được sử dụng để cung cấp

các khung vùng biến đổi. Thêm vào đó, các trình tự nhận xen kẽ của người có thể được sử dụng, ví dụ, cho chuỗi nặng và/hoặc nhẹ. Nếu các trình tự nhận khác nhau được sử dụng, một hoặc nhiều đột biến ngược được đề nghị trên đây có thể không được thực hiện vì các gốc cho và nhận tương ứng đã giống nhau sẵn mà không cần các đột biến ngược.

Một số đột biến thể hoặc đột biến ngược trong các biến thể Hu18C5 (bảo thủ hoặc không bảo thủ) không có tác động đáng kể trên ái lực liên kết hoặc hiệu lực của mAb được làm tương thích với người, nghĩa là, khả năng liên kết với TTR monome của nó (ví dụ, hiệu lực trong một số hoặc tất cả các thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ của kháng thể 18C5 biến đổi được làm tương thích với người gần như là giống, nghĩa là, trong khoảng sai số thí nghiệm, với hiệu lực của kháng thể 18C5 của chuột).

D. *Kháng thể khám và được nguy trang*

Sáng chế đề xuất thêm các dạng khám và được nguy trang của các kháng thể không phải của người, cụ thể là các kháng thể 18C5 trong các ví dụ.

Kháng thể khám là kháng thể trong đó các vùng biến đổi trưởng thành của các chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) được kết hợp với các vùng hằng định chuỗi nhẹ và nặng của người. Các kháng thể này gần như hoặc hoàn toàn giữ được tính đặc hiệu liên kết của kháng thể chuột, và là khoảng hai phần ba trình tự của người. Trong một phương án, kháng thể 18C5 khám có trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:81, trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:87, trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nặng người của SEQ ID NO: 17, và trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nhẹ của người là SEQ ID NO: 19.

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

trang của kháng thể 18C5 được bao gồm trong sáng chế.

E. Các kháng thể người

Kháng thể người kháng TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 101-109 (SEQ ID NO:30) của TTR) được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau được mô tả dưới đây. Một số kháng thể người được chọn lọc bằng các thí nghiệm liên kết cạnh tranh, bằng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn của Winter, trên đây, hoặc theo cách khác, để có cùng tính đặc hiệu epitop với kháng thể chuột cụ thể, chẳng hạn như một trong số các kháng thể đơn dòng của chuột được mô tả trong các ví dụ. Các kháng thể người cũng có thể được sàng lọc về tính đặc hiệu epitop cụ thể bằng cách chỉ sử dụng một đoạn TTR, chẳng hạn như biến thể TTR chỉ chứa các gốc axit amin 101-109 của TTR, làm kháng nguyên đích, và/hoặc bằng cách sàng lọc các kháng thể kháng lại tập hợp các biến thể TTR, chẳng hạn như các biến thể TTR chứa nhiều đột biến khác nhau trong các gốc axit amin 101-109 của TTR.

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

F. Lựa chọn vùng hằng định

Vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể khảm, được ngụy trang hoặc được làm tương thích với người có thể được liên kết với ít nhất là một phần của vùng hằng định của người. Việc lựa chọn vùng hằng định phụ thuộc, một phần, vào tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, sự thực bào phụ thuộc kháng thể và/hoặc tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể có được mong muốn hay không. Ví dụ, các isotyp IgG1 và IgG3 của người có tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể và các isotyp IgG2

và IgG4 của người thì không. IgG1 và IgG3 người cũng kích thích các chức năng hiệu ứng qua trung gian tế bào mạnh hơn so với IgG2 và IgG4 người. Các vùng hằng định chuỗi nhẹ có thể là lambda hoặc kappa. Các quy ước đánh số cho vùng hằng định bao gồm cách đánh số EU (Edelman, G.M. và đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. USA, 63, 78-85 (1969)), cách đánh số Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991, cách đánh số đơn nhất IMGT (Lefranc M.-P. và đồng tác giả, IMGT unique numbering for immunoglobulin and T cell receptor constant domains and Ig superfamily C-like domains, Dev. Comp. Immunol., 29, 185- 203 (2005), và cách đánh số exon IMGT (Lefranc, như trên).

Một hoặc một số axit amin ở các đầu cùng amino hoặc carboxy của chuỗi nhẹ và/hoặc nặng, chẳng hạn như lysin đầu cùng C của chuỗi nặng, có thể bị khuyết hoặc được tạo dẫn xuất ở một phần hoặc toàn bộ phân tử. Các đột biến thể có thể được tạo ra ở các vùng hằng định để làm giảm hoặc làm tăng chức năng hiệu ứng chẳng hạn như tác dụng gây độc tế bào qua trung gian bổ thể hoặc ADCC (xem, ví dụ, Winter và đồng tác giả, Patent Mỹ số 5,624,821; Tso và đồng tác giả, Patent Mỹ số 5,834,597; và Lazar và đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), hoặc để kéo dài thời gian bán thải ở người (xem, ví dụ, Hinton và đồng tác giả, J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Các đột biến thể điển hình bao gồm Gln ở vị trí 250 và/hoặc Leu ở vị trí 428 (cách đánh số EU được sử dụng trong đoạn này cho vùng hằng định) để làm tăng thời gian bán thải của kháng thể. Đột biến thể ở bất kỳ hoặc toàn bộ các vị trí 234, 235, 236 và/hoặc 237 làm giảm ái lực đối với các thụ thể Fcγ, cụ thể là thụ thể FcγRI (xem, ví dụ, US 6,624,821). Đột biến thể alanin ở các vị trí 234, 235, và 237 của IgG1 người có thể được sử dụng để làm giảm chức năng hiệu ứng. Một số kháng thể có đột biến thể alanin ở các vị trí 234, 235 và 237 của IgG1 người để làm giảm chức năng hiệu ứng. Tùy ý, các vị trí 234, 236 và/hoặc 237 ở IgG2 của người được thay thế bằng alanin và vị trí 235 bằng glutamin (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,624,821). Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329, và 331 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 318, 320, và 322 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và/hoặc 235 được thay thế bằng alanin và/hoặc vị trí 329 được thay thế bằng glyxin. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và 235 được thay thế bằng alanin, chẳng hạn như trong SEQ ID NO: 27.

Trong một số kháng thể, isotyp này là IgG2 hoặc IgG4 người.

Vùng hằng định kappa của chuỗi nhẹ của người được lấy làm ví dụ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:24. Arginin đầu cùng N của SEQ ID NO:24 có thể được loại bỏ, trong trường hợp này vùng cố định kappa của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:25. Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 người điển hình có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21 (có hoặc không có lysin đầu cùng C). Các kháng thể có thể được biểu hiện dưới dạng các tetrame chứa hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, dưới dạng các chuỗi nặng, các chuỗi nhẹ riêng biệt, như là Fab, Fab', F(ab')₂, và Fv, hoặc dưới dạng các kháng thể chuỗi đơn trong đó các vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ được nối qua đoạn đệm.

Các vùng hằng định của người thể hiện biến đổi allotyp và biến đổi isoallotyp giữa các cá thể khác nhau, nghĩa là, các vùng hằng định có thể khác nhau ở các cá thể khác nhau ở một hoặc nhiều vị trí đa hình. Isoallotyp khác với allotyp ở chỗ huyết thanh nhận biết isoallotyp liên kết với vùng không đa hình của một hoặc nhiều isotyp khác. Do đó, ví dụ, một vùng hằng định chuỗi nặng khác là thuộc allotyp IgG1 G1m3 và có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 22. Vùng hằng định chuỗi nặng khác của allotyp IgG1 G1m3 có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23 (có hoặc không có lysin đầu cùng C). Việc đề cập đến vùng hằng định của người bao gồm vùng hằng định với allotyp tự nhiên bất kỳ hoặc hoán vị bất kỳ của các gốc chiếm các vị trí trong các allotyp tự nhiên.

G. Biểu hiện kháng thể tái tổ hợp

Nhiều phương pháp đã được biết để tạo ra các kháng thể khảm và được làm tương thích với người bằng cách sử dụng dòng tế bào biểu hiện kháng thể (ví dụ, tế bào lai). Ví dụ, các vùng biến đổi globulin miễn dịch của các kháng thể có thể được tách dòng và giải trình tự bằng cách sử dụng các phương pháp đã được biết rõ. Trong một phương pháp, vùng VH biến đổi chuỗi nặng được tách dòng bằng RT-PCR bằng cách sử dụng mARN được tạo ra từ các tế bào lai. Các đoạn nối liên ứng được sử dụng cho peptit dẫn đầu vùng VH chứa codon khởi đầu dịch mã làm đoạn nối 5' và đoạn nối 3' đặc hiệu vùng hằng định g2b. Các đoạn nối điển hình được mô tả trong công bố patent US 2005/0009150 bởi Schenk và đồng tác giả. (sau đây gọi là "Schenk"). Các trình tự từ nhiều dòng, thu được độc lập có thể được so sánh để đảm bảo không có các thay đổi được đưa vào trong quá

trình khuếch đại. Trình tự của vùng VH cũng có thể được xác định hoặc được xác nhận bằng cách giải trình tự đoạn VH thu được bằng hệ phương pháp 5' RACE RT-PCR và đoạn môi đặc hiệu 3' g2b.

Vùng VL biến đổi chuỗi nhẹ có thể được tách dòng theo cách tương tự. Trong một phương pháp tiếp cận, tập hợp đoạn môi liên ứng được thiết kế để khuếch đại các vùng VL bằng cách sử dụng đoạn môi 5' được thiết kế để lai với vùng VL chứa codon khởi đầu dịch mã và đoạn môi 3' đặc hiệu với vùng Ck xuôi dòng của vùng nối V-J. Trong phương pháp tiếp cận thứ hai, hệ phương pháp 5'RACE RT-PCR được sử dụng để tách dòng cADN mã hóa VL. Các đoạn môi điển hình được mô tả trong Schenk, trên đây. Các trình tự đã tách dòng này sau đó được kết hợp với các trình tự mã hóa các vùng hằng định của người (hoặc loài không phải người khác). Các trình tự điển hình mã hóa các vùng hằng định của người bao gồm SEQ ID NO:32, mã hóa vùng hằng định IgG1 người, và SEQ ID NO:33 và 34, mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa người.

Trong một phương pháp tiếp cận, vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ được thao tác di truyền lại để mã hóa các trình tự cho nối xuôi dòng của các khớp nối VDJ hoặc VJ tương ứng và được tách dòng vào vector biểu hiện của động vật có vú, chẳng hạn như pCMV-hy1 đối với chuỗi nặng và pCMV-Mc1 đối với chuỗi nhẹ. Các vector này mã hóa các vùng hằng định $\gamma 1$ và Ck của người như các đoạn exon xuôi dòng của caset vùng biến đổi đã được gắn xen. Sau khi kiểm tra trình tự, vector biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào CHO để tạo ra các kháng thể khảm. Môi trường có điều kiện được thu gom 48 giờ sau chuyển nhiễm và được thử nghiệm bằng phân tích thẩm tách tây về khả năng sản sinh kháng thể hoặc bằng ELISA về khả năng liên kết kháng nguyên. Các kháng thể khảm này được làm tương thích với người như được mô tả trên đây.

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

chủ thích hợp, vật chủ này được nuôi trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện ở mức độ cao các trình tự nucleotit này và để thu gom và tinh chế các kháng thể phản ứng chéo.

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

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

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

Ngoài ra, các trình tự mã hóa kháng thể có thể được đưa vào các gen chuyển để đưa vào bộ gen của động vật chuyển gen và biểu hiện tiếp trong sữa của động vật chuyển gen này (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 5,741,957; Patent Mỹ số 5,304,489; và Patent Mỹ số

5,849,992). Các gen chuyển thích hợp bao gồm các trình tự mã hóa cho chuỗi nhẹ và/hoặc nặng được liên kết điều khiển được với trình tự khởi động và yếu tố tăng cường từ gen đặc hiệu tuyến vú, chẳng hạn như casein hoặc beta lactoglobulin.

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

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

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

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

W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; và US 5,888,809).

IV. Kháng nguyên hoạt động

Sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng chất gây đáp ứng miễn dịch chứa kháng thể kháng TTR. Chất này có thể tự cảm ứng các kháng thể và/hoặc cảm ứng kháng thể khi được liên kết với chất mang và/hoặc khi có mặt tá dược. Chất được sử dụng để gây miễn dịch chủ động này có tác dụng cảm ứng ở bệnh nhân cùng loại kháng thể đã mô tả liên quan đến phương pháp gây miễn dịch thụ động trên đây. Một số phương pháp này bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng nguyên chứa epitop mà liên kết đặc hiệu với kháng thể 18C5 trong phác đồ hữu hiệu để tạo ra kháng thể kháng TTR. Trong một số phương pháp, kháng nguyên bao gồm peptit TTR chứa đến 20 axit amin liên kề của TTR mà liên kết đặc hiệu với kháng thể 18C5. Trong một số phương pháp, kháng nguyên này chứa peptit TTR chứa đến 20 axit amin liên kề từ các gốc 89-127 của TTR. Trong một số phương pháp, kháng nguyên này chứa peptit TTR chứa đến 11 axit amin liên kề từ các gốc 100-110 của TTR. Trong một số phương pháp, kháng nguyên này chứa peptit TTR chứa đến 9 axit amin liên kề từ các gốc 101-109 của TTR. Trong một số phương pháp, epitop của peptit TTR chứa 4-11 axit amin liên kề từ các gốc 89-127 của TTR. Trong một số phương pháp, epitop của peptit TTR chứa 4-11 axit amin liên kề từ các gốc 100-110 của TTR. Trong một số phương pháp, epitop của peptit TTR chứa 4-9 axit amin liên kề từ các gốc 101-109 của TTR. Một số peptit TTR được sử dụng làm kháng nguyên thiếu epitop tế bào T. Các peptit này được liên kết với chất mang khác loại để cung cấp epitop tế bào T.

Để cảm ứng các kháng thể liên kết với cùng một epitop hoặc epitop gối lên nhau với 18C5, tính đặc hiệu epitop của các kháng thể này có thể được lập bản đồ (ví dụ, bằng cách kiểm tra khả năng liên kết với một loạt peptit gối lên nhau kéo dài TTR). Sau đó một đoạn của TTR bao gồm hoặc chứa hoặc gối lên epitop này có thể được sử dụng làm kháng nguyên.

Tùy ý, các peptit TTR được liên kết với chất mang khác loại và/hoặc được sử dụng kết hợp với tá dược để giúp tăng cường tạo ra kháng thể. Chất mang và tá dược khác loại, nếu được sử dụng có thể là giống như được sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng, nhưng

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

Nhiều đoạn thường được sử dụng với các tá dược được dụng. Tá dược này làm tăng hiệu giá của các kháng thể được cảm ứng và/hoặc ái lực liên kết của các kháng thể được cảm ứng so với trường hợp peptit này được sử dụng một mình. Nhiều loại tá dược khác nhau có thể được sử dụng kết hợp với đoạn kháng nguyên của TTR để gây ra đáp ứng miễn dịch. Tốt hơn nếu các tá dược làm tăng đáp ứng nội tại với kháng nguyên mà không gây ra sự thay đổi cấu hình trong kháng nguyên này mà ảnh hưởng đến dạng định tính của đáp ứng này. Các tá dược được ưu tiên hơn bao gồm các muối nhôm, như nhôm hydroxit và nhôm phosphat, 3 De-O-axyl hóa monophosphoryl lipit A (MPL™) (xem GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, hiện nay là một phần của Corixa). Stimulon™ QS-21 là triterpen glycosit hoặc saponin được phân lập từ vỏ của cây Quillaja

Saponaria Molina được tìm thấy ở Nam Mỹ (*xem Kensil và đồng tác giả, trong Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; now Antigenics, Inc., New York, NY). Các tá dược khác là các nhũ tương dầu trong nước (như squalen hoặc dầu lạc), tùy ý kết hợp với các chất kích thích miễn dịch, như monophosphoryl lipid A (*xem Stoute và đồng tác giả, N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), các polyme pluronic, và vi khuẩn mycobacterium bị diệt. Các tá dược Ribi là các nhũ tương dầu trong nước. Ribi chứa dầu chuyển hóa được (squalen) được nhũ hóa với nước muối chứa Tween 80. Ribi còn chứa các sản phẩm mycobacterium được tinh chế mà có tác dụng làm chất kích thích miễn dịch và monophosphoryl lipid A của vi khuẩn. Một tá dược khác là CpG (WO 98/40100). Các tá dược có thể được sử dụng làm thành phần của dược phẩm cùng với hoạt chất hoặc có thể được sử dụng riêng, trước, đồng thời với, hoặc sau khi sử dụng dược chất.

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

Các peptit (và tùy ý chất mang được dung hợp với peptit này) cũng có thể được sử dụng ở dạng axit nucleic mã hóa peptit này và được biểu hiện tại chỗ ở bệnh nhân. Đoạn axit nucleic mã hóa kháng nguyên thường được liên kết với các yếu tố điều hòa, như trình tự khởi động và trình tự tăng cường mà cho phép biểu hiện đoạn ADN này trong tế bào đích dự kiến của bệnh nhân. Để biểu hiện trong các tế bào máu, như được mong muốn để cảm ứng đáp ứng miễn dịch, trình tự khởi động và yếu tố tăng cường từ các gen globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng hoặc trình tự khởi động rất sớm chính CMV và các

gen tăng cường là thích hợp để điều khiển sự biểu hiện. Các yếu tố điều hòa được liên kết và các trình tự mã hóa thường được tách dòng vào vector. Các kháng thể cũng có thể được sử dụng ở dạng các axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ kháng thể. Nếu cả chuỗi nặng và nhẹ đều có mặt, các chuỗi này tốt hơn nếu được liên kết như là một kháng thể chuỗi đơn. Các kháng thể để sử dụng thụ động cũng có thể được tạo ra *ví dụ*, bằng sắc ký ái lực từ huyết thanh của bệnh nhân được điều trị bằng các kháng nguyên peptit.

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

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

H. Các thử nghiệm sàng lọc kháng thể

Các kháng thể có thể được sàng lọc bằng một số kỹ thuật sàng lọc bao gồm các thử nghiệm liên kết, kỹ thuật sàng lọc chức năng, sàng lọc trong mô hình động vật mắc bệnh liên quan đến các lắng đọng TTR, và các thử nghiệm lâm sàng. Các thử nghiệm liên kết kiểm tra khả năng liên kết đặc hiệu và, tùy ý, ái lực và tính đặc hiệu epitop với TTR monome hoặc một đoạn của nó. *Ví dụ*, các thử nghiệm liên kết có thể sàng lọc các kháng

thể liên kết với các gốc axit amin 101-109 (SEQ ID NO:30) của TTR, là các epitop bị vùi trong tetrame TTR tự nhiên và được bộc lộ ở dạng monome, bị gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR. Các kháng nguyên hoạt động cũng có thể được sàng lọc như vậy về khả năng cảm ứng các kháng thể có tính đặc hiệu liên kết này. Trong trường hợp này, kháng nguyên hoạt động được sử dụng để gây miễn dịch động vật thí nghiệm và huyết thanh thu được được kiểm tra về tính đặc hiệu liên kết thích hợp. Các kháng thể cũng có thể được sàng lọc về khả năng liên kết với các cấu hình tiền sợi, không tự nhiên của TTR và các sợi TTR dạng tinh bột nhưng không liên kết với các cấu hình TTR tự nhiên. Ví dụ, các kháng thể có thể được sàng lọc về khả năng liên kết với dạng monome của TTR được tạo ra bằng cách phân ly hoặc hoặc phân rã TTR tetrame tự nhiên, và có thể được sàng lọc ngược dựa trên TTR tetrame tự nhiên, như được mô tả trong các ví dụ hoặc các phần khác. Tương tự, các kháng thể cũng có thể được sàng lọc về khả năng phản ứng miễn dịch của chúng trên mô bị thoái hóa dạng tinh bột do TTR nhưng không phản ứng miễn dịch trên mô khỏe mạnh. Các kỹ thuật sàng lọc này đôi khi được thực hiện cạnh tranh với kháng thể đối chứng, chẳng hạn như kháng thể có các vùng biến đổi của 18C5 hoặc isotyp IgG1 kappa. Tùy ý, kháng thể này hoặc đích TTR được bất động trong thử nghiệm này.

Các thử nghiệm chức năng có thể được thực hiện trong các mô hình tế bào bao gồm các tế bào biểu hiện tự nhiên TTR hoặc được chuyển nhiễm với ADN mã hóa TTR hoặc một đoạn của nó. Các tế bào thích hợp bao gồm các tế bào thu được từ mô tim hoặc các mô khác bị ảnh hưởng bởi chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR. Các tế bào có thể được sàng lọc về mức độ giảm dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR (ví dụ, bằng phân tích thẩm tách Western hoặc kết tủa miễn dịch các dịch chiết tế bào hoặc dịch nổi tế bào) hoặc sự giảm độc tính do dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR. Ví dụ, các kháng thể có thể được kiểm tra về khả năng ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR, ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR, làm giảm các lắng đọng TTR, làm sạch TTR kết tụ, hoặc ổn định cấu hình không độc của TTR.

Các thử nghiệm chức năng khác có thể được thực hiện trong dung dịch, chẳng hạn như kiểm tra kháng thể có khả năng phá vỡ hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR hay không khi các chất trung gian TTR monome hoặc TTR bị gấp sai trong dung dịch được cho tiếp xúc với kháng thể này. Mức độ tạo sợi có thể được thăm dò bằng các phép đo độ đục, ví dụ, ở

400 nm trên máy đo phổ UV-khả kiến được lắp bộ phận điều khiển nhiệt độ. Thioflavin-T cũng có thể được sử dụng để đánh giá mức độ tạo sợi tinh bột. Ví dụ, lượng dư năm lần phân tử gam Thioflavin-T có thể được bổ sung vào các mẫu TTR và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi thực hiện các phép đo. Huỳnh quang Thioflavin-T có thể được theo dõi bằng cách sử dụng máy đo phổ huỳnh quang. Xem US 2014/0056904.

Kỹ thuật sàng lọc mô hình động vật kiểm tra khả năng của kháng thể hoặc kháng nguyên có hoạt tính trong việc điều trị phòng hoặc chữa các dấu hiệu hoặc triệu chứng trong mô hình động vật mô phỏng bệnh liên quan đến sự tích tụ TTR hoặc các lắng đọng TTR ở người. Các bệnh này bao gồm các dạng của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, chẳng hạn như bệnh thoái hóa dạng tinh bột ATTR kiểu hoang (còn được gọi là bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già SSA), bệnh thoái hóa dạng tinh bột tim do tuổi già (SCA), bệnh viêm đa dây thần kinh do dạng tinh bột di truyền (FAP), bệnh cơ tim dạng tinh bột di truyền (FAC), và bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (CNSA). Các dấu hiệu hoặc triệu chứng thích hợp mà có thể được theo dõi bao gồm sự có mặt và mức độ của các lắng đọng dạng tinh bột trong nhiều mô khác nhau, chẳng hạn như đường tiêu hóa hoặc tim. Các kháng nguyên hoạt động cũng có thể được kiểm tra về khả năng cảm ứng các kháng thể trong huyết thanh. Mức độ giảm các lắng đọng dạng tinh bột có thể được xác định bằng cách so sánh với đối chứng thích hợp, như mức nồng độ của các lắng đọng tinh bột TTR ở động vật đối chứng đã nhận được kháng thể đối chứng (ví dụ, kháng thể đối chứng phù hợp isotyp) hoặc kháng nguyên đối chứng, giả được, hoặc hoàn toàn không điều trị. Mô hình động vật điển hình để kiểm tra tác dụng chống lại bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR là mô hình chuột mang đột biến không có chức năng ở locut *Ttr* chuột nội sinh và gen *TTR* đột biến của người chứa đột biến V30M liên quan đến bệnh viêm đa dây thần kinh dạng tinh bột di truyền. Xem, ví dụ, Kohno và đồng tác giả, *Am. J. Path.* 150(4): 1497-1508 (1997); Cardoso và Saraiva, *FASEB J* 20(2):234-239 (2006). Các mô hình tương tự cũng tồn tại, bao gồm các mô hình khác cho dạng di truyền của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và các mô hình cho các dạng đơn phát của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Xem, ví dụ, Teng và đồng tác giả, *Lab. Invest.* 81(3): 385-396 (2001); Ito và Maeda, *Mouse Models of Transthyretin Amyloidosis*, in *Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, and Biological Functions*, pp. 261-280 (2009) (Springer Berlin Heidelberg). Các động vật chuyển gen có thể mang gen chuyển TTR của

người, chẳng hạn như gen chuyển TTR có đột biến liên quan đến bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR hoặc gen chuyển TTR kiểu hoang. Để tạo thuận lợi cho việc kiểm tra trong mô hình động vật, các kháng thể khảm có vùng hằng định thích hợp cho mô hình động vật này có thể được sử dụng (ví dụ, các thể khảm chuột nhắt-chuột cống có thể được sử dụng để kiểm tra các kháng thể ở chuột cống). Có thể kết luận là dạng được làm tương thích với người của kháng thể sẽ là hữu hiệu nếu kháng thể chuột hoặc kháng thể khảm tương ứng là hữu hiệu trong mô hình động vật thích hợp và kháng thể được làm tương thích với người này có ái lực liên kết tương tự (ví dụ, trong khoảng sai số thí nghiệm, chẳng hạn như bởi hệ số là 1,5, 2, hoặc 3).

Các thử nghiệm lâm sàng kiểm tra độ an toàn và hiệu lực ở người mắc bệnh liên quan đến bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR.

I. Axit nucleic

Sáng chế đề xuất thêm các axit nucleic mã hóa bất kỳ trong số các chuỗi nặng và nhẹ được mô tả trên đây (ví dụ, SEQ ID NO: 2, 4, 18, và 20). Tùy ý, các axit nucleic này mã hóa thêm peptit tín hiệu và có thể được biểu hiện với peptit tín hiệu được liên kết với vùng hằng định (ví dụ, các peptit tín hiệu có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 35 (chuỗi nặng) và 37 (chuỗi nhẹ) mà có thể được mã hóa lần lượt bởi SEQ ID NO: 36 (chuỗi nặng) và 38 (chuỗi nhẹ). Các trình tự axit nucleic mã hóa có thể được liên kết điều khiển được với các trình tự điều hòa để đảm bảo sự biểu hiện của các trình tự mã hóa, chẳng hạn như trình tự khởi động, yếu tố tăng cường, vị trí liên kết ribosom, tín hiệu kết thúc phiên mã, và tương tự. Các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ có thể xuất hiện ở dạng được phân lập hoặc có thể được tách dòng vào một hoặc nhiều vector. Các axit nucleic này có thể được tổng hợp bằng, ví dụ, phương pháp tổng hợp trạng thái rắn hoặc PCR của các oligonucleotit chồng lắp. Các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ có thể được nối như một axit nucleic liền kề, ví dụ, trong một vector biểu hiện, hoặc có thể là riêng biệt, ví dụ, mỗi axit nucleic được tách dòng vào vector biểu hiện riêng của nó.

J. Kháng thể liên hợp

Các kháng thể liên hợp liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên được bộc lộ ở dạng gây bệnh của TTR mà không phải ở dạng tetrame tự nhiên của TTR, như các gốc axit amin 101-109 (SEQ ID NO:30) của TTR, là hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của dạng

monome, bị gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR; theo dõi và đánh giá hiệu quả của các dược chất đang được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR; ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ TTR; ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR; làm giảm hoặc loại bỏ hết các lắng đọng TTR; làm ổn định các cấu hình không độc của TTR; hoặc điều trị hoặc có tác dụng phòng bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR ở bệnh nhân. Ví dụ, các kháng thể này có thể được liên hợp với các gốc điều trị khác, các protein khác, các kháng thể khác, và/hoặc các nhãn phát hiện được. Xem WO 03/057838; US 8,455,622.

Các gốc điều trị được liên hợp có thể là chất bất kỳ mà có thể được sử dụng để điều trị, chống, làm giảm, ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh hoặc tình trạng không mong muốn ở bệnh nhân, chẳng hạn như bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Các gốc điều trị có thể bao gồm, ví dụ, chất điều biến miễn dịch hoặc các chất có hoạt tính sinh học bất kỳ mà tạo thuận lợi hoặc tăng cường tác dụng của kháng thể. Chất điều biến miễn dịch có thể là chất bất kỳ mà kích thích hoặc ức chế sự phát triển hoặc sự duy trì đáp ứng miễn dịch. Nếu các gốc điều trị này được kết hợp với kháng thể đặc hiệu với dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR, chẳng hạn như các kháng thể được mô tả ở đây, các gốc điều trị đã kết hợp này sẽ có ái lực đặc hiệu với các dạng không tự nhiên, gây bệnh của TTR so với các dạng tetrame tự nhiên của TTR. Do đó, việc sử dụng các kháng thể liên hợp này trực tiếp nhằm vào các mô đích chứa các dạng gây bệnh của TTR với tổn thương tối thiểu cho mô bình thường, khỏe mạnh xung quanh. Điều này có thể đặc biệt hữu ích đối với các gốc điều trị quá độc để được sử dụng riêng. Thêm vào đó, các lượng nhỏ hơn của các gốc điều trị này có thể được sử dụng.

Ví dụ về các gốc điều trị thích hợp bao gồm các dược chất làm giảm mức nồng độ của TTR, làm ổn định cấu trúc tetrame tự nhiên của TTR, ức chế sự tích tụ TTR, phá vỡ sự tạo sợi TTR hoặc dạng tinh bột TTR, hoặc trung hòa độc tính tế bào. Xem, ví dụ, Almeida và Saraiva, *FEBS Letters* 586:2891-2896 (2012); Saraiva, *FEBS Letters* 498:201-203 (2001); Ando và đồng tác giả, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013); Ruberg và Berk, *Circulation* 126:1286-1300 (2012); Johnson và đồng tác giả, *J. Mol. Biol.* 421(2-3): 185-203 (2012, Ueda và Ando, *Translational Neurodegeneration* 3:19 (2014), và Hawkins và đồng tác giả *Annals of Medicine* 47:625-638 (2015)). Ví dụ, các kháng thể có thể được

liên hợp với tafamidis, diflunisal, ALN-TTR01, ALNTTR02, oligonucleotit đối nghĩa như IONIS TTRRx (inotersen), siARN như patisiran hoặc revusiran, doxycycline (doxy), axit tauroursodeoxycholic (TUDCA), Doxy- TUDCA, xyclodextrin (CyD), 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin (IDOX), epigallocatechin gallate (EGCG), curcumin, resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene), hoặc kháng thể liên hợp với thành phần tinh bột P trong huyết thanh (serum amyloid P: SAP). Các gốc điều trị điển hình khác bao gồm các chất khác đã được biết là hữu ích để điều trị, quản lý, hoặc cải thiện bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR hoặc các triệu chứng của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Xem, ví dụ, Ando và đồng tác giả, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013) về các triệu chứng lâm sàng phổ biến của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và các chất điển hình được sử dụng để điều trị các triệu chứng đó.

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

Các kháng thể đã mô tả ở đây cũng có thể được kết hợp hoặc liên hợp với một hoặc nhiều kháng thể khác (ví dụ, để tạo ra các thể liên hợp khác loài của kháng thể). Các kháng thể khác này có thể liên kết với các epitop khác nhau trong TTR hoặc một phần của chúng

hoặc có thể liên kết với kháng nguyên đích khác. Các kháng thể kháng TTR, mà liên kết với epitop TTR khác với epitop TTR của 18C5, có thể bao gồm các kháng thể như trong Bảng 3.

Các kháng thể cũng có thể được kết hợp với nhãn phát hiện được. Các kháng thể này có thể được sử dụng, ví dụ, để chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, để theo dõi sự tiến triển của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, và/hoặc để đánh giá hiệu quả của điều trị. Các kháng thể này là đặc biệt hữu ích để thực hiện các phép xác định này ở bệnh nhân mắc hoặc có nguy cơ bị mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, hoặc trong các mẫu sinh học thích hợp thu được từ các đối tượng này. Các nhãn phát hiện được điển hình mà có thể được kết hợp hoặc liên kết với kháng thể được bộc lộ ở đây bao gồm nhiều loại enzym khác nhau, chẳng hạn như peroxidaza của cây cải ngựa, phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; các nhóm prosthetic, như streptavidin, avidin hoặc biotin; các nguyên liệu huỳnh quang, chẳng hạn như umbelliferon, DyLight flo, floresxein, floresxein isothioxyanat, rodamin, diclorotriazinylamin floresxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; các nguyên liệu phát quang, chẳng hạn như luminol; các nguyên liệu phát quang sinh học, chẳng hạn như luxiferaza, luxiferin, và aequorin; các nguyên liệu có hoạt tính phóng xạ, chẳng hạn như yttri⁹⁰ (90Y), bạc phóng xạ-111, bạc phóng xạ-199, Bismut²¹³, iot (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), cacbon (¹⁴C), lưu huỳnh (³⁵S), triti (³H), indi (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), techneti (⁹⁹Tc), tali (²⁰¹Tl), gali (⁶⁸Ga, ⁶⁷Ga), paladi (¹⁰³Pd), molybden (⁹⁹Mo), xenon (¹³³Xe), flo (¹⁸F), ¹⁵³Sm, ¹⁷⁷Lu, ¹⁵⁹Gd, ¹⁴⁹Pm, ¹⁴⁰La, ¹⁷⁵Yb, ¹⁶⁶Ho, ⁹⁰Y, ⁴⁷Sc, ¹⁸⁶Re, ¹⁸⁸Re, ¹⁴²Pr, ¹⁰⁵Rh, ⁹⁷Ru, ⁶⁸Ge, ⁵⁷Co, ⁶⁵Zn, ⁸⁵Sr, ³²P, ¹⁵³Gd, ¹⁶⁹Yb, ⁵¹Cr, ⁵⁴Mn, ⁷⁵Se, ¹¹³Sn, và ¹¹⁷Tin; kim loại phát xạ positron sử dụng nhiều kỹ thuật chụp cắt lớp phát xạ positron khác nhau; các ion kim loại thuận từ không có hoạt tính phóng xạ; và các phân tử được đánh dấu phóng xạ hoặc được liên hợp với các đồng vị phóng xạ đặc hiệu. Các nhãn phát hiện được điển hình có thể được kết hợp hoặc liên kết với kháng thể được bộc lộ ở đây bao gồm nhãn điện hóa phát quang, ví dụ, MSD GOLD SULFOTAG NHS-Ester (SULFO-TAG) (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD).

Sự liên kết các đồng vị phóng xạ với các kháng thể có thể được thực hiện bằng các chelat hai chức thông thường. Đối với liên kết bạc phóng xạ-111 và bạc phóng xạ-199, các cầu nối dựa trên lưu huỳnh có thể được sử dụng. Xem Hazra và đồng tác giả, *Cell Biophys.*

24-25:1-7 (1994). Liên kết của các đồng vị phóng xạ bạc có thể bao gồm khủ globulin miễn dịch bằng axit ascorbic. Đối với các đồng vị phóng xạ chẳng hạn như ^{111}In và ^{90}Y , ibritumomab tiuxetan có thể được sử dụng và sẽ phản ứng với các chất đồng vị này để lần lượt tạo ra ^{111}In -ibritumomab tiuxetan và ^{90}Y -ibritumomab tiuxetan. Xem Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl LS91-S95 (2001).

Các gốc điều trị, các protein khác, các kháng thể khác, và/hoặc các nhãn phát hiện được có thể được kết hợp hoặc được liên hợp, trực tiếp hoặc gián tiếp qua trung gian (ví dụ, cầu nối), với kháng thể 18C5 của chuột, khảm, được ngưng trang hoặc được làm cho tương thích với người sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Xem ví dụ, Arnon và đồng tác giả, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", trong *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld và đồng tác giả (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom và đồng tác giả, "Antibodies For Drug Delivery", trong *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson và đồng tác giả (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", trong *Monoclonal Antibodies 84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera và đồng tác giả (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", trong *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin và đồng tác giả (eds.), trang 303-16 (Academic Press 1985); và Thorpe và đồng tác giả, *Immunol. Rev.*, 62:119-58 (1982). Các cầu nối thích hợp bao gồm, ví dụ, các cầu nối cắt được và không cắt được. Các cầu nối khác nhau mà giải phóng các gốc điều trị, các protein, các kháng thể và/hoặc các nhãn phát hiện được đã kết hợp trong các điều kiện axit hóa hoặc khủ, khi tiếp xúc với các proteaza đặc hiệu, hoặc trong các điều kiện xác định khác có thể được sử dụng.

V. Các ứng dụng điều trị

Các kháng thể trên đây có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở bệnh nhân mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh bị gây ra ít nhất một phần bởi transthyretin (TTR), và cụ thể là bởi dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR. Mặc dù sự hiểu biết về cơ chế là không cần thiết cho việc thực hành, tin rằng bất kỳ hoặc toàn bộ các cơ chế sau đây có thể góp phần vào việc điều trị bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR sử

dụng các kháng thể trên đây: tác dụng ức chế sự kết tụ và tạo sợi TTR do kháng thể, tác dụng làm ổn định cấu hình không độc của TTR (ví dụ, các dạng tetrame) do kháng thể, hoặc tác dụng đào thải TTR kết tụ, TTR oligome, TTR monome do kháng thể. Các thể liên hợp kháng thể-độc chất có thể có các cơ chế tác dụng khác nữa được quyết định bởi góc được liên hợp này.

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

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

Số lượng liều được sử dụng phụ thuộc vào việc rối loạn là cấp tính hay mãn tính và đáp ứng của rối loạn với việc điều trị. Đối với các rối loạn cấp tính hoặc tình trạng trầm trọng cấp tính của rối loạn mãn tính, từ 1 đến 10 liều thường là đủ. Đôi khi, một liều lớn duy nhất, tùy ý ở dạng được chia nhỏ, là đủ cho rối loạn cấp tính hoặc tình trạng trầm trọng

cấp tính của rối loạn mãn tính. Việc điều trị có thể được lặp lại cho sự tái phát của rối loạn cấp tính hoặc tình trạng trầm trọng cấp tính. Đối với các rối loạn mãn tính, kháng thể có thể được sử dụng cách nhau các khoảng thời gian đều đặn, ví dụ, hàng tuần, hai tuần một lần, hàng tháng, hàng quý, mỗi sáu tháng một lần, trong ít nhất là 1, 5 hoặc 10 năm, hoặc toàn bộ cuộc đời của bệnh nhân.

VI. Dược phẩm và phương pháp sử dụng

Được đề xuất ở đây là một số phương pháp chẩn đoán, theo dõi, điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bị gây ra ít nhất một phần bởi transthyretin (TTR), và cụ thể là bởi dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR). ví dụ về bệnh này bao gồm bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR di truyền, như bệnh cơ tim dạng tinh bột di truyền (FAC) hoặc bệnh cơ tim hoặc bệnh phì đại tim ở vận động viên hoặc người tập aerobic nặng, bệnh viêm đa dây thần kinh dạng tinh bột di truyền (FAP), hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (CNSA), và bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR đơn phát, như bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già (SSA) hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột ở tim do tuổi già (SCA). Bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR cũng có thể là nguyên nhân hoặc kết quả của nhiều bệnh và tình trạng khác nhau được đặc trưng bởi sự chấn thương hoặc thoái hóa mô hoặc cơ quan. Sự tích tụ các lắng đọng TTR góp phần gây rối loạn chức năng cơ quan hoặc mô liên quan đến bệnh hoặc tình trạng này. Ví dụ về tình trạng có thể điều trị hoặc phòng ngừa bằng các chất và các phương pháp này là hẹp ống tủy sống (Westermarck và đồng tác giả, *Upsala J. Medical Sciences* 119, 223-238 (2014) và Yanagisawa và đồng tác giả, *Modern Pathology* 28, 201-207 (2015)). Bệnh khác tương tự có thể điều trị hoặc phòng ngừa được là thoái hóa khớp (Takanashi và đồng tác giả, *Amyloid* 20, 151-155 (2013), Gu và đồng tác giả, *Biomed & Biotechnol.* 15, 92-99; Takinami và đồng tác giả, *Biomarker Insights* 8, 85-95 (2014); Akasaki và đồng tác giả, *Arthritis Rheumatol.* 67, 2097-2107 (2015)). Bệnh khác tương tự có thể phòng ngừa hoặc điều trị được là bệnh viêm khớp dạng thấp (Clement và đồng tác giả, *JCI Insight* 1 epublish (2016)). Bệnh khác có thể phòng ngừa hoặc điều trị được là bệnh viêm khớp thiếu niên tự phát (Sharma và đồng tác giả, *PLoS One* 9, e93905; 1-12 (2014)). Bệnh khác có thể phòng ngừa hoặc điều trị được là bệnh thoái hóa điểm vàng do tuổi già (ướt hoặc khô). Một nhóm các tình trạng khác tương tự có thể phòng ngừa hoặc điều trị

được là các rối loạn gân và dây chằng, như các rối loạn chớp xoay (Sueyoshi và đồng tác giả, *Human Pathol.* 42, 1259-64 (2011)).

Các kháng thể được mô tả trên đây có thể được đưa vào dược phẩm để sử dụng trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bất kỳ trong số các bệnh và tình trạng trên đây. Nói chung, kháng thể hoặc dược phẩm chứa kháng thể được sử dụng cho đối tượng cần nó. Các bệnh nhân phải điều trị bao gồm các cá thể có nguy cơ mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR nhưng chưa thể hiện các triệu chứng, cũng như các bệnh nhân đang có triệu chứng. Một số bệnh nhân có thể được điều trị trong giai đoạn tiền triệu của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR.

Dược phẩm này có thể được sử dụng để phòng bệnh cho các cá thể có nguy cơ mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR do di truyền đã biết. Các cá thể này bao gồm các cá thể có họ hàng đã mắc bệnh này, và các cá thể có nguy cơ đã xác định được bằng phân tích gen đánh dấu hóa sinh hoặc di truyền (ví dụ, các đột biến trong TTR liên quan đến bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR), bao gồm sử dụng các phương pháp chẩn đoán được đề xuất ở đây. Ví dụ, có hơn 100 đột biến trong gen mã hóa TTR có liên quan đến bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Xem, ví dụ, US 2014/0056904; Saraiva, *Hum. Mutat.* 17(6):493-503 (2001); Damas và Saraiva, *J. Struct. Biol.* 130:290-299; Dwulet và Benson, *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 114:657-662 (1983).

Các cá thể mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR đôi khi có thể được nhận diện nhờ các biểu hiện lâm sàng của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, bao gồm một hoặc nhiều biểu hiện sau đây: (1) tiền sử gia đình mắc bệnh thần kinh, đặc biệt là liên quan đến bệnh suy tim; (2) bệnh đau thần kinh hoặc các rối loạn cảm giác tiến triển có nguyên nhân chưa rõ; (3) hội chứng ống cổ tay không có nguyên nhân rõ ràng, đặc biệt là nếu nó ở cả hai bên và đòi hỏi phải phẫu thuật; (4) các rối loạn vận động dạ dày ruột hoặc rối loạn thần kinh thực vật có nguyên nhân chưa rõ (ví dụ, rối loạn cương cứng, tụt huyết áp tư thế đứng, hội chứng bàng quang do bệnh thần kinh); (5) bệnh tim được đặc trưng bởi thành tâm thất bị dày lên mà không tăng huyết áp; (6) chèn nhĩ thất tiến triển có nguyên nhân chưa rõ, đặc biệt là khi kèm theo tim bị dày lên; và (7) thể vùi trong dịch thủy tinh kiểu bông-len. Xem Ando và đồng tác giả, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Tuy nhiên, chẩn đoán chính thức bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR thường dựa vào các mẫu sinh thiết cơ

quan đích, sau đó nhuộm mô học mô đã cắt ra bằng thuốc nhuộm đặc hiệu tinh bột, đồ Congo. Nếu xét nghiệm dương tính với tinh bột được quan sát thấy, việc nhuộm hóa học mô miễn dịch và kỹ thuật xác định bằng phương pháp khối phổ đối với TTR được thực hiện tiếp để đảm bảo là protein tiền chất chịu trách nhiệm về sự tạo tinh bột thực sự là TTR. Đối với các dạng di truyền của các bệnh này, việc chứng minh có đột biến trong gen mã hóa TTR sau đó là cần thiết trước khi chẩn đoán chính thức được thực hiện.

Việc xác định đối tượng này có thể xảy ra ở bệnh viện, hoặc nơi khác, chẳng hạn như ở nhà của đối tượng này, ví dụ, nhờ việc sử dụng riêng kit tự kiểm tra của đối tượng này. Ví dụ, đối tượng này có thể được nhận diện dựa trên nhiều triệu chứng khác nhau chẳng hạn như bệnh thần kinh ngoại biên (vận động và cảm giác), bệnh thần kinh thực vật, bệnh suy yếu đường tiêu hóa, bệnh cơ tim, bệnh thận, hoặc lắng đọng mắt. Xem Ando và đồng tác giả, *Orphanet Journal of Rare Diseases* 8:31 (2013). Đối tượng này cũng có thể được nhận diện bởi các mức nồng độ của các dạng không tự nhiên của TTR trong mẫu huyết tương của đối tượng này bị gia tăng so với các mẫu đối chứng, như được mô tả trong các ví dụ.

Khi đã được xác nhận bởi tiền sử gia đình, xét nghiệm di truyền, hoặc sàng lọc y tế đối với bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, việc điều trị có thể bắt đầu ở độ tuổi bất kỳ (ví dụ, 20, 30, 40, 50, 60, hoặc 70 tuổi). Việc điều trị thường đòi hỏi nhiều liều trong một khoảng thời gian và có thể được theo dõi bằng cách phân tích đáp ứng kháng thể hoặc tế bào B hoặc tế bào T hoạt hóa với dược chất (ví dụ, dạng bị cắt của TTR chứa các gốc axit amin 101-109) theo thời gian. Nếu đáp ứng này giảm, liều tăng cường được chỉ định.

Trong các ứng dụng phòng bệnh, kháng thể hoặc chất cảm ứng kháng thể hoặc được phẩm chứa kháng thể được sử dụng cho đối tượng dễ bị mắc, hoặc theo cách khác, có nguy cơ mắc bệnh (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR) theo phác đồ (liều, tần số và đường sử dụng) hữu hiệu để làm giảm nguy cơ, làm giảm mức độ nghiêm trọng, hoặc làm chậm sự xuất hiện của ít nhất là một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh này. Trong các ứng dụng điều trị, kháng thể hoặc chất kháng nguyên để cảm ứng kháng thể được sử dụng cho đối tượng bị nghi ngờ, hoặc đã mắc bệnh (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR) theo phác đồ (liều, tần số và đường sử dụng) hữu hiệu để cải thiện hoặc ít nhất là ức chế sự hủy hoại thêm của ít nhất là một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh này.

Phác đồ được xem là hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa nếu từng đối tượng được điều trị đạt được kết quả tốt hơn so với kết quả trung bình trong quần thể đối chứng gồm các đối tượng tương đương mà không được điều trị bằng các phương pháp đã mô tả ở đây, hoặc nếu kết quả tốt hơn được chứng minh cho phác đồ ở các đối tượng được điều trị so với các đối tượng đối chứng trong thử nghiệm lâm sàng có đối chứng (ví dụ, thử nghiệm lâm sàng pha II, pha II/III, hoặc pha III) hoặc mô hình động vật ở $p < 0,05$ hoặc 0,01 hoặc thậm chí mức 0,001.

Phác đồ hữu hiệu của kháng thể có thể được sử dụng để, ví dụ, ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc phải tình trạng liên quan đến sự tích lũy TTR; ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc phải tình trạng liên quan đến tích lũy TTR; làm giảm hoặc đào thải các lắng đọng TTR hoặc TTR kết tụ ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc phải tình trạng liên quan đến tích lũy TTR; làm ổn định cấu hình không độc của TTR ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc phải tình trạng liên quan đến tích lũy TTR; ức chế tác dụng gây độc của các khối kết tụ, sợi hoặc lắng đọng TTR ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc phải tình trạng liên quan đến tích lũy TTR; chẩn đoán sự có hoặc không có tích lũy TTR dạng tinh bột ở mô bị nghi ngờ có sự tích lũy dạng tinh bột; xác định mức lắng đọng TTR ở đối tượng bằng cách phát hiện sự có mặt của kháng thể đã liên kết ở đối tượng này sau khi sử dụng kháng thể; phát hiện sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR ở đối tượng; theo dõi và đánh giá hiệu quả của các dược chất đang được sử dụng để điều trị cho các bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR; gây đáp ứng miễn dịch bao gồm kháng thể với TTR ở đối tượng; làm chậm sự xuất hiện của tình trạng liên quan đến tích lũy TTR dạng tinh bột ở đối tượng; hoặc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR ở bệnh nhân.

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

Khoảng liều điển hình đối với kháng thể có thể là từ khoảng 0,1-20, hoặc 0,5-5 mg/kg thể trọng (ví dụ, 0,5, 1, 2, 3, 4 hoặc 5 mg/kg) hoặc 10-1500 mg dưới dạng liều cố định. Liều này phụ thuộc vào tình trạng của bệnh nhân và đáp ứng với điều trị trước đó,

nếu có, dù điều trị này là phòng ngừa hay chữa bệnh và dù rối loạn này là cấp tính hay mãn tính, trong số các yếu tố khác.

Kháng thể có thể được sử dụng trong các liều hàng ngày, cách ngày, hàng tuần, hai tuần một lần, hàng tháng, hàng quý hoặc theo lịch bất kỳ khác được xác định bằng phân tích theo kinh nghiệm. Phương pháp điều trị điển hình đòi hỏi sử dụng nhiều liều trong một khoảng thời gian kéo dài, ví dụ, ít nhất là sáu tháng. Phác đồ điều trị điển hình khác đòi hỏi sử dụng một lần mỗi hai tuần hoặc một lần mỗi tháng hoặc một lần mỗi 3 đến 6 tháng.

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

Các kháng thể hoặc chất tạo ra kháng thể có thể được sử dụng bằng đường ngoại biên. Các đường sử dụng bao gồm tại chỗ, trong tĩnh mạch, đường miệng, dưới da, trong động mạch, trong hộp sọ, nội tủy mạc, trong màng bụng, trong mũi hoặc trong cơ. Đường sử dụng điển hình của các kháng thể có thể là trong tĩnh mạch hoặc dưới da. Các đường gây miễn dịch chủ động điển hình là dưới da và trong cơ. Đường sử dụng trong tĩnh mạch có thể là, ví dụ, truyền trong khoảng thời gian chẳng hạn như 30-90 phút. Kiểu tiêm này được thực hiện phổ biến nhất trong cơ cánh tay hoặc cẳng chân. Trong một số phương pháp, các chất được tiêm trực tiếp vào mô cụ thể nơi mà các lắng đọng bị tích lũy, ví dụ, tiêm trong hộp sọ.

Dược phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể là vô trùng và gần như đẳng trương (250-350 mOsm/kg nước) và được sản xuất trong các điều kiện GMP. Dược phẩm có thể được cung cấp ở dạng liều đơn vị (nghĩa là, liều để sử dụng một lần duy nhất). Dược

phẩm có thể được bào chế bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất phụ gia được chấp nhận về mặt sinh lý. Dạng bào chế phụ thuộc vào đường sử dụng đã chọn. Để tiêm, kháng thể có thể được bào chế thành dung dịch nước, ví dụ, trong các dung dịch đệm phù hợp về sinh lý chẳng hạn như dung dịch Hank, dung dịch Ringer, hoặc nước muối sinh lý hoặc dung dịch đệm axetat (để làm giảm sự khó chịu ở vị trí tiêm). Dung dịch này có thể chứa tá dược chẳng hạn như các chất tạo huyền phù, chất ổn định và/hoặc phân tán. Ngoài ra, các kháng thể có thể ở dạng đông khô để hoàn nguyên với tá dược lỏng thích hợp, ví dụ, nước vô trùng không chứa chất gây sốt, trước khi sử dụng.

Các phác đồ có thể được sử dụng kết hợp với, đồng thời với, hoặc lần lượt với một chất khác hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đang được điều trị. Các chất này có thể bao gồm siARN để ức chế sự biểu hiện của TTR hoặc Vyndaqel, chất làm ổn định TTR ở cấu hình tetrame. Các chất này có thể bao gồm chất làm ổn định tetrame TTR như tafamidis hoặc diflunisal (xem, ví dụ, WO2011116123, Patent Mỹ số 9,150,489), liệu pháp gen để ức chế sự biểu hiện TTR như oligonucleotit đối nghĩa như IONIS-TTRRx (inotersen) (xem, ví dụ, Patent Mỹ số 8,101,743, 8,697,860, 9,061,044, và 9,399,774; Patent Nhật số JP5896175) hoặc siARN như patisiran hoặc revusiran (xem, ví dụ, WO2016033326), các hợp chất gây thoái biến dạng tinh bột như doxycycline (doxy), axit tauroursodeoxycholic (TUDCA), Doxy-TUDCA, xyclodextrin (CyD), 4'-iodo-4'-deoxydoxorubicin (IDOX), hoặc kháng thể với thành phần dạng tinh bột P trong huyết thanh (SAP).

Chất khác hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đang được điều trị có thể được sử dụng cho đối tượng đã được điều trị trước đó bằng kháng thể được mô tả ở đây. Đối tượng được điều trị bằng chất khác hữu ích trong việc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đang được điều trị có thể không còn nhận được liệu pháp điều trị với kháng thể được mô tả ở đây nữa.

Việc điều trị bằng kháng thể được mô tả ở đây có thể được kết hợp với các liệu pháp điều trị khác hữu hiệu chống lại rối loạn đang được điều trị. Các liệu pháp điều trị kết hợp có thể được bào chế cùng nhau hoặc được sử dụng riêng. Một số ví dụ về các liệu pháp điều trị hữu ích cho các liệu pháp kết hợp bao gồm kháng thể kháng TTR thứ hai liên kết

với epitop khác với epitop của 18C5, ví dụ, kháng thể được mô tả trong Bảng 3.

Sau khi điều trị, tình trạng của đối tượng có thể được đánh giá để xác định sự tiến triển hoặc hiệu quả của phương pháp điều trị này. Các phương pháp này tốt hơn, nếu kiểm tra được các thay đổi về mức nồng độ dạng tinh bột TTR hoặc mức nồng độ dạng không tự nhiên của TTR. Ví dụ, các mức nồng độ dạng tinh bột TTR có thể được đánh giá để xác định sự cải thiện so với mức nồng độ dạng tinh bột TTR của đối tượng này trong các hoàn cảnh tương đương trước khi điều trị. Mức nồng độ dạng tinh bột TTR của đối tượng này cũng có thể được so sánh với quần thể đối chứng trong các hoàn cảnh tương đương. Các quần thể đối chứng có thể là các đối tượng bị mắc bệnh tương tự, chưa được điều trị hoặc các đối tượng bình thường không được điều trị (trong số các đối tượng đối chứng khác). Sự cải thiện so với các đối tượng mắc bệnh tương tự, chưa được điều trị hoặc các mức nồng độ xấp xỉ hoặc đạt tới mức nồng độ ở các đối tượng bình thường không điều trị chỉ ra là đáp ứng dương tính với điều trị.

Mức nồng độ dạng tinh bột TTR có thể được đo bằng nhiều phương pháp, bao gồm các kỹ thuật chụp ảnh. Ví dụ về các kỹ thuật chụp ảnh thích hợp bao gồm quét PET với TTR được đánh dấu phóng xạ hoặc các đoạn của nó, các kháng thể TTR hoặc các đoạn của nó, các chất chụp ảnh dạng tinh bột dựa trên đỏ Congo, chẳng hạn như, ví dụ, PIB (US 2011/0008255), peptit chụp ảnh dạng tinh bột p31 (Biodistribution of amyloid-imaging peptide, p31, correlates with amyloid quantitation based on Congo red tissue staining, Wall và đồng tác giả, Abstract No. 1573, 2011 ISNM Annual Meeting), và các nhãn PET khác. Mức nồng độ dạng không tự nhiên của TTR có thể đo được, ví dụ, bằng cách thực hiện các thử nghiệm SDS-PAGE/thẩm tách Western hoặc thử nghiệm đĩa Meso Scale Discovery với các kháng thể được mô tả ở đây trên các mẫu huyết tương hoặc mẫu sinh thiết của đối tượng và so sánh với các mẫu đối chứng, như được mô tả trong các ví dụ.

A. Phương pháp theo dõi và chẩn đoán

Cũng được đề xuất là các phương pháp phát hiện đáp ứng miễn dịch kháng TTR ở bệnh nhân mắc hoặc dễ bị mắc bệnh liên quan đến lắng đọng TTR hoặc các dạng gây bệnh của TTR (ví dụ, dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR). Các phương pháp này có thể được sử dụng để theo dõi liệu trình điều trị phòng ngừa và chữa bệnh bằng các chất được đề xuất ở đây. Profin của kháng thể sau khi gây miễn dịch thụ động thường

thể hiện đỉnh tức thời của nồng độ kháng thể sau đó giảm theo hàm số mũ. Nếu không có liều bổ sung, sự suy giảm này đạt tới mức nồng độ trước điều trị trong khoảng vài ngày đến vài tháng tùy theo thời gian bán thải của kháng thể được sử dụng. Ví dụ, thời gian bán thải của một số kháng thể của người là khoảng 20 ngày.

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

Cũng được đề xuất là các phương pháp phát hiện dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR ở đối tượng, ví dụ, bằng cách đo dạng tinh bột TTR hoặc các dạng gây bệnh của TTR (ví dụ, dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR) trong mẫu từ đối tượng hoặc bằng cách chụp ảnh *in vivo* TTR ở đối tượng. Các phương pháp này là hữu ích để chẩn đoán hoặc xác nhận chẩn đoán các bệnh liên quan đến các dạng gây bệnh của TTR này (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR), hoặc khả năng bị nhiễm bệnh này. Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng trên các đối tượng không có triệu chứng. Sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR chỉ ra khả năng dễ bị mắc bệnh có triệu chứng trong tương lai. Các phương pháp này cũng là hữu ích để theo dõi sự tiến triển và/hoặc đáp ứng của bệnh với phương pháp điều trị ở các đối tượng đã được chẩn đoán trước đó là mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR.

Các mẫu sinh học thu được từ đối tượng mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc có nguy cơ mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR có thể được cho tiếp xúc với các kháng thể được

mô tả ở đây để đánh giá sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR. Ví dụ, mức nồng độ của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR trong các đối tượng này có thể được so sánh với các mức nồng độ có mặt ở các đối tượng khỏe mạnh. Ngoài ra, các mức nồng độ của dạng tinh bột TTR hoặc các dạng gây bệnh của TTR (ví dụ, dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR) ở các đối tượng nhận phương pháp điều trị bệnh này có thể được so sánh với các mức nồng độ của các đối tượng chưa được điều trị bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Một số xét nghiệm này bao gồm mẫu sinh thiết mô thu được từ các đối tượng này. Các thử nghiệm ELISA cũng có thể được sử dụng, ví dụ, để đánh giá các mức nồng độ của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR trong các mẫu lỏng. Một số thử nghiệm ELISA này bao gồm các kháng thể kháng TTR mà liên kết ưu tiên với dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR so với các dạng tetrame bình thường của TTR.

Một số xét nghiệm này là thử nghiệm miễn dịch kiểu bánh kẹp. Một số thử nghiệm miễn dịch này sử dụng nền tảng điện hóa phát quang Meso Scale Discovery (MSD) (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD.) Một số thử nghiệm miễn dịch này sử dụng các nhãn điện hóa phát quang trên các kháng thể chỉ thị, ví dụ, các thử nghiệm MSD (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD.) Ví dụ, kháng thể chỉ thị có thể được đánh dấu bằng nhãn SULFO-TAG ((Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Các đĩa hữu ích trong thử nghiệm điện hóa phát quang có thể kết hợp các điện cực (ví dụ, các đĩa MSD (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Các đĩa hữu ích trong thử nghiệm điện hóa phát quang có thể kết hợp các điện cực ở đáy của mỗi giếng (ví dụ, các đĩa MSD (Meso Scale Diagnostics, Rockville, MD). Một số thử nghiệm sử dụng kháng thể bắt giữ được đánh dấu. Ví dụ, kháng thể bắt giữ được đánh dấu có thể là 18C5 hoặc biến thể được làm tương thích với người, khảm, hoặc được nguy trang của chúng. Một số thử nghiệm sử dụng kháng thể chỉ thị được đánh dấu. Ví dụ, kháng thể chỉ thị được đánh dấu có thể là 18C5 hoặc biến thể được làm tương thích với người, khảm, hoặc được nguy trang của chúng. Kháng thể chỉ thị được đánh dấu cũng có thể là kháng thể của Bảng 3, hoặc biến thể được làm tương thích với người, khảm, hoặc được nguy trang của chúng. Kháng thể chỉ thị được đánh dấu có thể là kháng thể liên kết với TTR mà không có tính đặc hiệu cấu hình. Trong một phương án, kháng thể liên kết với TTR mà không có tính đặc hiệu cấu hình có thể là 8C3 hoặc 7G7 hoặc biến thể được làm tương thích với người, khảm, hoặc được nguy trang của chúng

(Xem, ví dụ., WO 2016/120811). Trong một phương án, kháng thể liên kết với TTR mà không có tính đặc hiệu cấu hình có thể là kháng thể đa dòng. Trong một phương án, kháng thể đa dòng là kháng thể thử kháng tiền albumin người đa dòng (Số Cat. A000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA). Trong một phương án, kháng thể kháng TTR của thử đa dòng là Sigma, Catalog No. HPA002550 (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO),

Một số thử nghiệm phát hiện tất cả TTR bị gấp sai trong mẫu (nghĩa là, tất cả các dạng bị gấp sai của TTR bao gồm monome và đa phân tử). Các thử nghiệm khác phát hiện đặc hiệu TTR monome bị gấp sai hoặc TTR bị gấp sai đa phân tử. Các thử nghiệm khác phát hiện tất cả các dạng của TTR (dạng bị gấp sai và dạng tetrame tự nhiên). Một số thử nghiệm này sử dụng kháng thể bắt giữ liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR và kháng thể chỉ thị liên kết đặc hiệu với epitop khác của TTR; trong đó nếu TTR bị gấp sai có mặt trong mẫu này, kháng thể bắt giữ và kháng thể chỉ thị liên kết với TTR bị gấp sai tạo thành phức hợp dạng bánh kẹp; và trong đó việc phát hiện kháng thể chỉ thị liên kết với TTR bị gấp sai, nếu có, chỉ ra sự có mặt hoặc vắng mặt của toàn bộ các dạng bị gấp sai của TTR có mặt trong mẫu này. Các kháng thể chỉ thị này có thể bao gồm 9D5, 14G8, 5A1, 6C1, AD7F6, RT24, NI-301.35G11, MFD101, MFD102, MFD103, MFD105, MFD107, MFD108, MFD109, MFD111, MFD114, hoặc dạng khảm hoặc dạng được làm tương thích với người của nó. Các kháng thể chỉ thị này có thể bao gồm kháng thể liên kết trong các gốc 89-97, 118-122, 115-124, 53-63, 54-61, 36-49, 49-61, 109-121, 30-66, 70-127, 80-127, 90-127, 100-127, 110-127, hoặc 115-127 của TTR. Các kháng thể chỉ thị này có thể bao gồm 8C3 hoặc 7G7 (xem, ví dụ, WO 2016/120811). Các kháng thể chỉ thị này có thể bao gồm tiền albumin thử kháng người đa dòng (Số Cat. A000202-2, Dako, Agilent Technologies, Inc, Santa Clara, CA) hoặc kháng thể kháng TTR thử đa dòng (Sigma, Catalog No. HPA002550, Sigma-Aldrich, St. Louis, MO).

Một số thử nghiệm phát hiện các dạng đa phân tử của TTR bị gấp sai trong mẫu. Các thử nghiệm này có thể được thiết kế để phát hiện TTR bị gấp sai đa phân tử ưu tiên hơn hoặc chọn lọc so với TTR bị gấp sai monome. Một số thử nghiệm này sử dụng kháng thể bắt giữ liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR và kháng thể chỉ thị liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Tổ hợp này của kháng thể bắt giữ và kháng thể chỉ thị có thể liên kết ưu tiên hơn hoặc chọn lọc với TTR

đa phân tử so với monome vì nhiều bản sao của TTR cung cấp nhiều epitop cho sự liên kết kháng thể. Việc phát hiện kháng thể chỉ thị đã liên kết với TTR bị gấp sai đa phân tử, nếu có, chỉ ra sự có mặt hoặc vắng mặt của TTR bị gấp sai đa phân tử. Trong một số thử nghiệm như vậy, kháng thể chỉ thị cạnh tranh để liên kết vào TTR với kháng thể bắt giữ và/hoặc kháng thể chỉ thị và kháng thể bắt giữ liên kết với cùng một epitop hoặc epitop chồng lặp của TTR. Trong các thử nghiệm như vậy, kháng thể bắt giữ liên kết với phân tử TTR bị gấp sai thứ nhất trong TTR bị gấp sai đa phân tử, và kháng thể chỉ thị liên kết với phân tử TTR bị gấp sai thứ hai trong TTR bị gấp sai đa phân tử. Sự cạnh tranh để liên kết giữa kháng thể bắt giữ và kháng thể chỉ thị ngăn chặn hoặc ít nhất là làm giảm (phụ thuộc vào việc sự cạnh tranh là kết quả của các epitop chồng lặp hay sự cản trở không gian) sự liên kết đồng thời và sự phát hiện TTR bị gấp sai monome. Trong các thử nghiệm như vậy, việc phát hiện sự liên kết kháng thể chỉ thị mà liên kết với phân tử TTR bị gấp sai thứ hai trong TTR đa phân tử chỉ ra sự có mặt hoặc vắng mặt của TTR bị gấp sai đa phân tử.

Các kháng thể được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng trong phương pháp xác định tỉ lệ giữa mức nồng độ của transthyretin bị gấp sai đa phân tử toàn phần (TTR) so với mức nồng độ của TTR bị gấp sai toàn phần trong mẫu sinh học. Phần thứ nhất của mẫu sinh học có thể được thử nghiệm về toàn bộ TTR bị gấp sai trong mẫu (nghĩa là, toàn bộ các dạng bị gấp sai của TTR bao gồm các monome và dạng đa phân tử) trong thử nghiệm thứ nhất trong đó TTR bị gấp sai monome và bị gấp sai đa phân tử được phát hiện. Thử nghiệm thứ nhất này có thể sử dụng kháng thể bắt giữ liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR và kháng thể chỉ thị liên kết đặc hiệu với epitop khác của TTR. Nếu TTR bị gấp sai có mặt trong mẫu này, kháng thể bắt giữ và kháng thể chỉ thị liên kết với TTR bị gấp sai tạo thành phức hợp dạng bánh kẹp. Việc phát hiện kháng thể chỉ thị liên kết với TTR bị gấp sai, nếu có, chỉ ra sự có mặt hoặc vắng mặt của TTR bị gấp sai trong mẫu này. Phần thứ hai của mẫu sinh học có thể được thử nghiệm về các dạng đa phân tử của TTR bị gấp sai trong mẫu sinh học trong thử nghiệm thứ hai để phát hiện TTR bị gấp sai đa phân tử ưu tiên hơn so với TTR bị gấp sai monome. Thử nghiệm thứ hai có thể sử dụng kháng thể bắt giữ liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR và kháng thể chỉ thị liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR. Nếu TTR bị gấp sai đa phân tử có mặt trong mẫu này, kháng thể bắt giữ và kháng thể chỉ thị liên kết với TTR bị gấp sai đa phân tử tạo thành phức hợp dạng bánh kẹp. Kháng thể bắt giữ và kháng

thể chỉ thị có thể liên kết đồng thời, ưu tiên hơn hoặc chọn lọc với TTR bị gấp sai đa phân tử, nếu có, để chỉ ra sự có mặt hoặc vắng mặt của TTR bị gấp sai đa phân tử. Trong một số thử nghiệm như vậy, kháng thể chỉ thị cạnh tranh để liên kết vào TTR với kháng thể bắt giữ hoặc liên kết với cùng một epitop hoặc epitop chồng lặp với kháng thể bắt giữ. Trong các thử nghiệm như vậy, kháng thể bắt giữ liên kết với phân tử TTR bị gấp sai thứ nhất trong TTR bị gấp sai đa phân tử, và kháng thể chỉ thị liên kết với phân tử TTR bị gấp sai thứ hai trong TTR bị gấp sai đa phân tử. Sự cạnh tranh để liên kết giữa kháng thể bắt giữ và kháng thể chỉ thị ngăn chặn hoặc ít nhất là làm giảm (phụ thuộc vào việc sự cạnh tranh là kết quả của các epitop chồng lặp hay sự cản trở không gian) sự liên kết đồng thời và sự phát hiện TTR bị gấp sai monome. Trong các thử nghiệm như vậy, việc phát hiện sự liên kết kháng thể chỉ thị mà liên kết với phân tử TTR bị gấp sai thứ hai trong TTR đa phân tử chỉ ra sự có mặt hoặc vắng mặt của TTR bị gấp sai đa phân tử. Trong một số thử nghiệm như vậy, tỉ lệ của TTR bị gấp sai đa phân tử so với toàn bộ TTR bị gấp sai được tính toán.

Các kháng thể được bộc lộ ở đây cũng có thể được sử dụng trong phương pháp xác định tỉ lệ của mức nồng độ của toàn bộ TTR bị gấp sai so với TTR toàn phần (dạng bị gấp sai và dạng tetrame tự nhiên) trong mẫu sinh học. Phần thứ nhất của mẫu sinh học có thể được thử nghiệm về toàn bộ TTR bị gấp sai trong mẫu (nghĩa là, toàn bộ các dạng bị gấp sai của TTR bao gồm các monome và dạng đa phân tử) trong thử nghiệm thứ nhất trong đó TTR bị gấp sai monome và bị gấp sai đa phân tử được phát hiện. Thử nghiệm thứ nhất này có thể sử dụng kháng thể bắt giữ liên kết đặc hiệu với epitop nằm trong các gốc 101-109 của TTR và kháng thể chỉ thị liên kết đặc hiệu với epitop khác của TTR. Nếu TTR bị gấp sai có mặt trong mẫu này, kháng thể bắt giữ và kháng thể chỉ thị liên kết với TTR bị gấp sai tạo thành phức hợp dạng bánh kẹp. Việc phát hiện kháng thể chỉ thị liên kết với TTR bị gấp sai, nếu có, chỉ ra sự có mặt hoặc vắng mặt của TTR bị gấp sai trong mẫu này. Phần thứ hai của mẫu sinh học có thể được thử nghiệm về TTR toàn phần (các dạng bị gấp sai và dạng tetrame tự nhiên) trong thử nghiệm thứ hai trong đó TTR toàn phần được phát hiện. Thử nghiệm thứ hai này có thể sử dụng kháng thể bắt giữ liên kết với TTR mà không có tính đặc hiệu cấu hình và kháng thể chỉ thị liên kết với TTR mà không có tính đặc hiệu cấu hình. Nếu TTR có mặt trong mẫu này, kháng thể bắt giữ và kháng thể chỉ thị liên kết với TTR bị gấp sai tạo thành phức hợp dạng bánh kẹp. Việc phát hiện kháng thể chỉ thị liên kết với TTR, nếu có, chỉ ra sự có mặt hoặc vắng mặt của TTR trong mẫu này. Tỉ lệ của

TTR bị gấp sai toàn phần so với TTR toàn phần (dạng bị gấp sai và dạng tetrame tự nhiên) có thể được tính toán.

Các phương pháp chụp ảnh in vivo có thể hoạt động bằng cách sử dụng chất phản ứng, chẳng hạn như kháng thể liên kết với dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR ở đối tượng này, và sau đó phát hiện chất phản ứng này sau khi nó đã liên kết. Các kháng thể này thường liên kết với epitop trong các gốc 101-109 của TTR. Nếu muốn, đáp ứng đào thải có thể tránh được bằng cách sử dụng các đoạn kháng thể thiếu vùng hằng định có chiều dài đầy đủ, chẳng hạn như Fab. Trong một số phương pháp, cùng một kháng thể có thể đóng vai trò cả chất phản ứng điều trị và chẩn đoán.

Các chất phản ứng chẩn đoán có thể được sử dụng bằng cách tiêm tĩnh mạch vào cơ thể của đối tượng, hoặc bằng cách đường hợp lý khác. Liều của chất phản ứng nên nằm trong các khoảng giống như đối với các phương pháp điều trị. Thông thường, chất phản ứng này được đánh dấu, mặc dù trong một số phương pháp, chất phản ứng chính có ái lực với dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR không được đánh dấu và chất đánh dấu phụ được sử dụng để liên kết với chất phản ứng chính này. Việc lựa chọn nhãn phụ thuộc vào cách thức phát hiện. Ví dụ, nhãn huỳnh quang là thích hợp để phát hiện bằng mắt thường. Việc sử dụng các nhãn thuận từ là thích hợp để phát hiện bằng cách chụp cắt lớp mà không cần can thiệp phẫu thuật. Các nhãn có hoạt tính phóng xạ cũng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng PET hoặc SPECT.

Các phương pháp chẩn đoán được thực hiện bằng cách so sánh số lượng, kích thước, và/hoặc cường độ của các locut đã được đánh dấu với các giá trị đường cơ sở tương ứng. Các giá trị đường cơ sở này có thể thể hiện các mức nồng độ trung bình trong quần thể gồm các cá thể không mắc bệnh. Các giá trị đường cơ sở cũng có thể thể hiện các mức nồng độ trước đó đã được xác định ở cùng đối tượng này. Ví dụ, các giá trị đường cơ sở có thể được xác định ở đối tượng trước khi bắt đầu điều trị, và các giá trị đo được sau đó được so sánh với các giá trị đường cơ sở. Sự giảm các giá trị so với đường cơ sở thường báo hiệu đáp ứng dương tính với điều trị.

Việc theo dõi các thay đổi về lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, sự liên kết kháng thể kháng TTR hoặc tương tự cho phép điều chỉnh phác đồ điều trị theo việc điều trị này. Sau đó có thể quyết định có điều chỉnh phương

pháp điều trị hay không và nếu muốn, phương pháp điều trị có thể được điều chỉnh tương ứng với việc theo dõi. Thay đổi đáng kể có nghĩa là việc so sánh trị số của một tham số sau điều trị so với nền để cung cấp một số bằng chứng cho thấy việc điều trị có hoặc không gây ra tác dụng có lợi. Trong một số trường hợp, sự thay đổi các trị số của một tham số ở chính bệnh nhân cung cấp bằng chứng cho thấy việc điều trị có hoặc không gây ra tác dụng có lợi. Trong các trường hợp khác, sự thay đổi của các trị số, nếu có, ở bệnh nhân, được so sánh với sự thay đổi của các trị số, nếu có, ở quần thể bệnh nhân đối chứng đại diện không được điều trị. Sự khác biệt về đáp ứng ở một bệnh nhân cụ thể so với đáp ứng bình thường ở bệnh nhân đối chứng (ví dụ, trị số trung bình cộng phương sai của độ lệch chuẩn) cũng có thể cung cấp bằng chứng là phác đồ điều trị đang đạt được hoặc không đạt được tác dụng có lợi ở bệnh nhân. Sự thay đổi về các trị số TTR trên đây cũng có thể được kết hợp với (các) thay đổi khác về dấu hiệu hoặc triệu chứng như các tác dụng phụ để xác định có điều chỉnh phương pháp điều trị hay không và điều chỉnh như thế nào.

Ở một số bệnh nhân, việc theo dõi chỉ ra rằng lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc sự liên kết kháng thể kháng TTR là bằng hoặc lớn hơn so với được phát hiện trước đó. Ở các bệnh nhân này, nếu không có tác dụng phụ không chấp nhận được, phác đồ điều trị này có thể được tiếp tục như vậy hoặc thậm chí được gia tăng về tần số sử dụng và/hoặc liều nếu vẫn chưa phải ở liều được đề nghị cao nhất.

Ở một số bệnh nhân, việc theo dõi chỉ ra có sự giảm phát hiện được về lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, sự liên kết kháng thể kháng TTR hoặc tương tự nhưng lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc sự liên kết kháng thể kháng TTR này vẫn trên mức bình thường. Ở các bệnh nhân này, nếu không có tác dụng phụ không chấp nhận được, phác đồ điều trị này có thể được tiếp tục như vậy hoặc thậm chí được gia tăng về tần số sử dụng và/hoặc liều nếu vẫn chưa phải ở liều được đề nghị cao nhất. Theo cách khác, ở một số bệnh nhân, phác đồ điều trị có thể được dừng lại và thay thế bằng phương pháp điều trị với chất khác, như chất làm ổn định tetrame TTR, điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa, điều trị dựa trên can thiệp ARN (ARNi) hoặc doxycycline cộng axit tauroursodeoxycholic.

Nếu việc theo dõi chỉ ra rằng lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các

lắng đọng transthyretin, liên kết kháng thể kháng TTR hoặc tương tự ở bệnh nhân đã được làm giảm đến hoặc gần mức bình thường của lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc lượng liên kết kháng thể kháng TTR, phác đồ điều trị này có thể được điều chỉnh từ việc cảm ứng (nghĩa là, làm giảm lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc liên kết kháng thể kháng TTR) đến duy trì (nghĩa là, duy trì lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc liên kết kháng thể kháng TTR ở mức xấp xỉ hằng định). Phác đồ này có thể được tác động bằng cách làm giảm liều và hoặc tần số sử dụng phương pháp điều trị. Theo cách khác, ở một số bệnh nhân, phác đồ điều trị có thể được dừng lại và thay thế bằng phương pháp điều trị với chất khác, như chất làm ổn định tetrame TTR, điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa, điều trị dựa trên can thiệp ARN (ARNi) hoặc doxycycline cộng axit tauroursodeoxycholic.

Ở các bệnh nhân khác, việc theo dõi có thể chỉ ra là phác đồ điều trị đang có một số tác dụng có lợi nhưng là tác dụng dưới mức tối ưu. Tác dụng tối ưu có thể được định nghĩa là tỉ lệ phần trăm giảm về lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc liên kết kháng thể kháng TTR nằm trong khoảng một phần hai hoặc một phần tư phía trên của sự thay đổi về lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc lượng liên kết kháng thể kháng TTR) được trải qua bởi mẫu đại diện của các bệnh nhân đang được điều trị bằng phác đồ điều trị này ở thời điểm đã cho sau liệu pháp khởi đầu. Bệnh nhân có sự giảm ít hơn hoặc bệnh nhân có lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc liên kết kháng thể kháng TTR vẫn không đổi hoặc thậm chí tăng nhưng ở mức độ ít hơn so với dự kiến khi không có phác đồ điều trị (ví dụ, như được suy luận từ nhóm bệnh nhân đối chứng không được sử dụng phác đồ điều trị này) có thể được phân loại là có đáp ứng tích cực nhưng dưới mức tối ưu. Các bệnh nhân này có thể tùy ý là đối tượng để điều chỉnh phác đồ trong đó liều và/hoặc tần số sử dụng của một chất được gia tăng. Theo cách khác, hoặc thêm vào đó, nếu việc điều chỉnh tăng không gây ra đáp ứng được cải thiện, ở một số bệnh nhân, phác đồ điều trị có thể được dừng lại và thay thế bằng phương pháp điều trị với chất khác, như chất làm ổn định tetrame TTR, điều trị dựa trên oligonucleotit đối nghĩa, điều trị dựa trên can thiệp ARN (ARNi) hoặc doxycycline cộng axit tauroursodeoxycholic.

Ở một số bệnh nhân, lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc liên kết kháng thể kháng TTR có thể tăng theo cách tương tự hoặc lớn hơn so với lượng TTR bị gấp sai, TTR bị gấp sai đa phân tử, các lắng đọng transthyretin, hoặc liên kết kháng thể kháng TTR ở bệnh nhân không nhận được điều trị. Nếu sự tăng này kéo dài trong một khoảng thời gian, việc điều trị có thể, nếu muốn, được dừng lại để điều trị bằng một hoặc nhiều chất khác.

Các phương pháp chẩn đoán bằng các kháng thể được bộc lộ ở đây có thể được thực hiện kết hợp với kháng thể kháng TTR thứ hai liên kết với epitop khác với epitop của 18C5, ví dụ, kháng thể như được bộc lộ trong Bảng 3.

Cũng được đề xuất là các phương pháp phân biệt bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin với bệnh thoái hóa dạng tinh bột không do TTR, ví dụ bệnh thoái hóa dạng tinh bột thể chuỗi nhẹ globulin miễn dịch (AL), còn được biết là bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân nguyên phát.

IX. Kit

Sáng chế đề xuất thêm kit (ví dụ, đồ bao gói) chứa kháng thể 18C5 được làm tương thích với người được mô tả ở đây và các nguyên liệu liên quan, chẳng hạn như các hướng dẫn sử dụng (ví dụ, tờ hướng dẫn sử dụng). Các hướng dẫn sử dụng có thể bao gồm, ví dụ, các hướng dẫn để sử dụng kháng thể và tùy ý một hoặc nhiều chất bổ sung. Các đồ bao gói chứa kháng thể có thể là các liều đơn vị, các gói gộp (ví dụ, gói nhiều liều), hoặc các liều dưới đơn vị.

Hướng dẫn sử dụng dùng để chỉ các hướng dẫn thường được bao gồm trong các gói thương mại của dược phẩm chứa thông tin về chỉ định, công dụng, liều dùng, cách sử dụng, chống chỉ định, và/hoặc khuyến cáo liên quan đến việc sử dụng các dược phẩm này.

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

X. Các ứng dụng khác

Các kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của transthyretin (TTR), hoặc các đoạn của nó, trong trường hợp điều trị hoặc chẩn đoán lâm sàng hoặc trong nghiên cứu. Ví dụ, các kháng thể này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR trong mẫu sinh học như là dấu hiệu chỉ ra rằng mẫu sinh học này chứa các lắng đọng dạng tinh bột TTR. Sự liên kết của các kháng thể này với mẫu sinh học có thể được so sánh với khả năng liên kết của các kháng thể với mẫu đối chứng. Mẫu đối chứng này và mẫu sinh học này có thể chứa các tế bào có cùng nguồn gốc mô. Các mẫu đối chứng và các mẫu sinh học có thể thu được từ cùng một cá thể hoặc nhiều cá thể khác nhau và tại cùng một thời điểm hoặc vào nhiều thời điểm khác nhau. Nếu muốn, nhiều mẫu sinh học và nhiều mẫu đối chứng được đánh giá vào nhiều thời điểm để bảo vệ chống lại sự biến thiên ngẫu nhiên độc lập với các sai khác giữa các mẫu này. Sau đó so sánh trực tiếp có thể được thực hiện giữa (các) mẫu sinh học này và (các) mẫu đối chứng này để xác định khả năng liên kết của kháng thể (nghĩa là, sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR) với (các) mẫu sinh học được gia tăng, giảm đi hay giữ nguyên so với khả năng liên kết của kháng thể với (các) mẫu đối chứng. Khả năng liên kết của kháng thể với (các) mẫu sinh học tăng lên so với (các) mẫu đối chứng chỉ ra sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR trong (các) mẫu sinh học này. Trong một số trường hợp, sự liên kết của kháng thể tăng lên có ý nghĩa thống kê. Tùy ý, sự liên kết của kháng thể với mẫu sinh học cao hơn ít nhất là 1,5 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 10 lần, 20 lần, hoặc 100 lần so với khả năng liên kết của kháng thể này với mẫu đối chứng.

Thêm vào đó, các kháng thể này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR trong mẫu sinh học để theo dõi và đánh giá hiệu quả của dược chất đang được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân đã được chẩn đoán mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Mẫu sinh học của bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR được đánh giá để thiết lập đường cơ sở cho sự liên kết của kháng thể với mẫu này (nghĩa là, đường cơ sở cho sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR trong mẫu này) trước khi bắt đầu liệu pháp với dược chất này. Trong một số trường hợp, nhiều mẫu sinh học của bệnh nhân được đánh giá

tại nhiều thời điểm để thiết lập đường cơ sở và đo biến thiên ngẫu nhiên không phụ thuộc vào điều trị. Sau đó một được chất được sử dụng theo phác đồ. Phác đồ này có thể bao gồm nhiều lần sử dụng được chất này trong một khoảng thời gian. Tùy ý, sự liên kết của các kháng thể (nghĩa là, sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR) được đánh giá vào nhiều thời điểm trong nhiều mẫu sinh học của bệnh nhân, để thiết lập phép đo biến thiên ngẫu nhiên và thể hiện xu hướng đáp ứng với liệu pháp miễn dịch. Sau đó nhiều đánh giá khác nhau về khả năng liên kết của kháng thể với mẫu sinh học được so sánh. Nếu chỉ có hai đánh giá được thực hiện, so sánh trực tiếp có thể được thực hiện giữa hai đánh giá này để xác định khả năng liên kết của kháng thể (nghĩa là, sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR) đã tăng, giảm hay giữ nguyên giữa hai đánh giá này. Nếu nhiều hơn hai phép đo được thực hiện, các phép đo này có thể được phân tích theo dòng thời gian bắt đầu từ trước khi điều trị bằng được chất và tiếp tục xuyên suốt thời gian điều trị. Ở các bệnh nhân có sự liên kết của kháng thể với mẫu sinh học giảm đi (nghĩa là, sự có mặt của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR), có thể kết luận là được chất này là hữu hiệu để điều trị bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR ở bệnh nhân. Sự giảm về khả năng liên kết của kháng thể có thể có ý nghĩa thống kê. Tùy ý, khả năng liên kết giảm ít nhất là 1%, 2%, 3%, 4%, 5%, 10%, 15%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 100%. Việc đánh giá khả năng liên kết của kháng thể có thể được thực hiện kèm theo đánh giá các dấu hiệu và triệu chứng khác của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR.

Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng làm các chất nghiên cứu để nghiên cứu trong phòng thí nghiệm để phát hiện dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR, hoặc các đoạn của nó. Trong các ứng dụng này, các kháng thể có thể được đánh dấu bằng các phân tử huỳnh quang, các phân tử được đánh dấu spin, các enzym, hoặc các đồng vị phóng xạ, và có thể được cung cấp ở dạng kit có tất cả các chất phản ứng cần thiết để thực hiện xét nghiệm phát hiện này. Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để tính chế dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR, hoặc các phân tử đối tác liên kết của dạng monome, bị gấp sai, bị kết tụ hoặc dạng sợi của TTR, ví dụ, bằng sắc ký ái lực.

Các kháng thể cũng có thể được sử dụng để ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR,

ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR, làm giảm hoặc đào thải các lắng đọng TTR hoặc các khối kết tụ TTR, hoặc làm ổn định các cấu hình không độc của TTR trong mẫu sinh học. Mẫu sinh học này có thể bao gồm, ví dụ, máu, huyết thanh, huyết tương, hoặc mô (ví dụ, mô từ tim, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thần kinh thực vật, thận, mắt, mỡ bụng, hoặc đường tiêu hóa). Trong một số trường hợp, sự kết tụ TTR, sự tạo sợi TTR, hoặc các lắng đọng TTR bị ức chế hoặc làm giảm ít nhất là 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, hoặc 75%, (ví dụ, 10%-75% hoặc 30%-70%). Các thử nghiệm phát hiện sự tạo sợi được mô tả ở các phần khác ở đây. *Cũng xem* US 2014/0056904.

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

Ví dụ thực hiện sáng chế

Ví dụ 1. Tạo ra kháng nguyên và gây miễn dịch cho chuột đối với 18C5

Cả chuột cái BALB/c và C57BL/6 đều được tiêm bằng transthyretin được thao tác di truyền với đột biến ở F87M và L110M được gọi là đột biến kép transthyretin (TTR-DM). Việc tiêm trong màng bụng 50 µg/ chuột trong ba lần tiêm sau đó là 25 µg/chuột trong 3 lần tiêm và sau đó là 10 µg/chuột trong 4 lần tiêm TTR-DM được nhũ hóa trong tá được RIBI được tiêm hàng tuần bằng cách sử dụng 5 BALB/c, thêm vào đó 5 chuột

C57BL/6 được tiêm trong 3 lần tiêm ở 50 μg /chuột, 3 lần tiêm ở 25 μg /chuột và 4 lần tiêm ở 10 μg /chuột được nhũ hóa trong tá dược RIBI. Chuột được xác định hiệu giá kháng TTR-DM, TTR tetrame tự nhiên, và his-MCAM. Chuột có các hiệu giá cao nhất với TTR-DM và hiệu giá thấp nhất với TTR tetrame tự nhiên và his-MCAM (BALB/c #1 và 5 và C57BL/6 #4 và 5) được hợp nhất lại bằng biến đổi của Kohler và Milstein. Các thể lai thu được được sàng lọc theo TTR-DM, TTR tetrame tự nhiên và his-MCAM. Các thể lai thể hiện tính đặc hiệu với TTR-DM được tách dòng và được phân tích thêm. 18C5 được nhận diện.

Ví dụ 2. Phân tích 18C5 bằng BIAcore

Phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 để so sánh ái lực liên kết của kháng thể chuột với TTR người tái tổ hợp bị biến tính trong Guanidin Hydroclorua (Gu-hTTR) 6M, TTR của Cynomolgus bị biến tính trong Guanidin Hydroclorua (Gu-cTTR) 6 M và TTR người tetrame tự nhiên. Kháng thể chuột được bất động trên chip cảm biến CM3 (GE Healthcare Life Sciences) bằng cách tạo cặp amin, và các kháng thể chuột (phối tử) được bắt giữ đến mức đảm bảo sự liên kết tối đa của chất phân tích là 50 RU (xấp xỉ 250RU của sự liên kết phối tử). Nhiều nồng độ khác nhau của Gu-TTR (khoảng từ 0,4 nM đến 100 nM) được cho qua phối tử bị bắt giữ ở 50 μL /phút trong đệm chạy (HBS + P-20 0,05%, BSA 1 mg/mL, Gu-HCl 50mM) trong thời gian kết hợp 300 giây và thời gian phân ly 900 giây. Sự tái tạo của bề mặt chip được thực hiện bằng 2 lần tiêm ngắn Glyxin-HCl 10mM ở độ pH=1,7. Các nồng độ Gu-cTTR được sử dụng nằm trong khoảng từ 1-1000 nM, trong khi các nồng độ của tetrame TTR người nằm trong khoảng từ 10 nM đến 10.000 nM. Số liệu được trừ trắng đối với cả cảm biến không chứa phối tử và nồng độ chất phân tích 0 nM. Phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng sự ăn khớp 1:1 chung với phần mềm Biacore Evaluation (v3.0) với chỉ số khúc xạ gộp được đặt bằng 0 RU. Số liệu liên kết được thể hiện trong Bảng 4.

Bảng 4. Số liệu liên kết của 18C5 đối với TTR bị gấp sai của người và TTR bị gấp sai của Cynomolgus, và tetrame TTR người.

TTR	k_a 1/Ms	k_d 1/s	K_D nM
TTR bị gấp sai của người	$1,1 \times 10^5$	$6,2 \times 10^{-4}$	5,9 nM

TTR bị gấp sai của Cynomolgus	1,0X10 ⁵	9,2X10 ⁻⁴	Khả năng liên kết tối thiểu ở nồng độ cao nhất, khó dự tính KD
Tetrame TTR người	2,2X10 ³	2,2X10 ⁻⁴	Khả năng liên kết tối thiểu ở nồng độ cao nhất, khó dự tính KD

Ví dụ 3: Mô tả 18C5 kháng bằng BIAcore

Phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 để so sánh ái lực liên kết của kháng thể chuột và kháng thể khảm với TTR người tái tổ hợp bị biến tính trong Guanidin Hydroclorua 6M (Gu-hTTR). Kháng thể người được bắt động trên tế bào dòng 1 và 2, kháng thể chuột được bắt động trên tế bào dòng 3 và 4 và chip cảm biến CM3 (GE Healthcare Life Sciences) bằng cách tạo cặp amin, và các kháng thể 18C5 khảm và chuột (phối tử) được bắt giữ đến mức đảm bảo sự liên kết tối đa của chất phân tích là 50 RU (xấp xỉ 250RU của sự liên kết phối tử). Nhiều nồng độ khác nhau của Gu-TTR (khoảng từ 0,4 nM đến 100 nM) được cho qua phối tử bị bắt giữ ở 50 μ L/phút trong đệm chạy (HBS + P-20 0,05%, BSA 1 mg/mL, Gu-HCl 50mM) trong thời gian kết hợp 300 giây và thời gian phân ly 900 giây. Sự tái tạo của bề mặt chip được thực hiện bằng 2 lần tiêm ngắn Magie Clorua 3M hoặc 2 lần tiêm ngắn Glyxin-HCl 10mM ở độ pH=1,7. Số liệu được trừ trắng đối với cả cảm biến không chứa phối tử và nồng độ chất phân tích 0 nM. Phân tích được thực hiện bằng cách sử dụng sự ăn khớp 1:1 chung với phần mềm Biacore Evaluation (v3.0) với chỉ số khúc xạ gộp được đặt bằng 0 RU. Số liệu liên kết được thể hiện trong Bảng 5.

Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của kháng thể 18C5 khảm được đề xuất là SEQ ID NO:81, trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của kháng thể 18C5 khảm được đề xuất là SEQ ID NO:87; trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nặng người là SEQ ID NO: 17, và trình tự axit amin vùng hằng định chuỗi nhẹ của người là SEQ ID NO: 19.

Bảng 5. Số liệu liên kết cho kháng thể chuột và kháng thể khảm với TTR người tái tổ hợp bị biến tính trong Guanidin Hydroclorua (Gu-hTTR) 6M.

TTR	ka 1/Ms	kd 1/s	K _D nM
18C5 khảm	1,3X10 ⁵	1,6X10 ⁻⁴	1,8 nM
18C5 chuột	9,9X10 ⁴	2,1X10 ⁻⁴	2,2 nM

Ví dụ 4: Lập bản đồ epitop của 18C5

Việc lập bản đồ ban đầu chỉ ra epitop cho 18C5 nằm trong các axit amin 87-127 của SEQ ID NO: 26. Việc lập bản đồ thêm chỉ ra epitop này nằm trong khoảng axit amin 101-109 của SEQ ID NO:26. Ái lực thấp hơn nhiều với TTR bị gấp sai của *Cynomolgus* chỉ ra rằng axit amin 104 là quan trọng vì đây là đột biến thể axit amin duy nhất giữa TTR người và *Cynomolgus*.

Ví dụ 5: Trình tự của 18C5

Thể lai 18C5 dòng LA89 18C5. Pelet tế bào đông lạnh Al.Al được sử dụng để chiết và tinh chế mARN. Việc phân lập và tinh chế mARN được thực hiện bằng cách sử dụng quy trình mini kit mARN trực tiếp Oligotex (Qiagen, cat# 72022). Nói ngắn gọn, 9x10⁶ tế bào dòng lai được dung giải và được làm đồng nhất khi có mặt đệm guanidin-isothioxyanat gây biến tính cao, làm bất hoạt RNaza. Huyền phù oligotex được bổ sung vào hỗn hợp dung giải, việc lai được cho phép xảy ra giữa oligo dT30 của các hạt oligotex và đuôi poly-A của mARN. Sau đó các tạp chất được rửa và poly-A⁺ ARN được rửa giải. mARN được phiên mã đảo thành cADN bằng cách sử dụng kit khuếch đại Marathon cADN (Clontech, cat# 634913). Trình tự tiếp hợp được nối vào đầu 5' của cADN. Phương pháp 5' RACE được sử dụng để khuếch đại các vùng V. Các đoạn nối liên ứng 5' vùng V và các đoạn nối neo đặc hiệu vùng hằng định được sử dụng cho PCR. Vùng V đã khuếch đại được tách dòng vào vectơ tách dòng pTOPO và được biến nạp vào Top10 *E. coli*. 15-20 khuẩn lạc đơn lẻ được nuôi và plasmit đã tinh chế được giải trình tự. Trình tự dòng được xem là trình tự vùng V thực sự nếu nó đáp ứng các tiêu chuẩn sau đây

Không có codon dừng giữa vùng Met và C

Trình tự này chứa các đặc điểm chính của các vùng V của kháng thể

Trình tự này chứa các CDR có thể xác định được.

Tối thiểu ba dòng độc lập có ORF ăn khớp

Các trình tự vùng biến đổi xác định được được tách dòng vào các vector biểu hiện và được chuyển nhiễm vào các tế bào CHO. Kháng thể khảm đã tinh chế được phân tích về khả năng liên kết bằng cách sử dụng 18C5 chuột làm kháng thể đối chứng.

Trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của 18C5 được đề xuất là SEQ ID NO:81, và trình tự axit amin vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của 18C5 được đề xuất là SEQ ID NO:87. Trình tự axit amin CDR-H1, CDR-H2, và CDR-H3 chuỗi nặng tổ hợp Kabat/Chothia được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO: 5, 7, và 9. Trình tự axit amin CDR-L1, CDR-L2, và CDR-L3 chuỗi nhẹ tổ hợp Kabat/Chothia được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO: 11, 13, và 15.

Ví dụ 6: Tính đặc hiệu của 18C5 được chứng minh bằng phân tích thâm tách Western

Để chứng minh tính đặc hiệu cấu hình của 18C5 với TTR không tự nhiên (bị biến tính), phân tích thâm tách Western được thực hiện như sau:

Quy trình:

Gel SDS-polyacrylamit

TTR tự nhiên: Mẫu 1,0, 0,5, và 0,1 μg của TTR người tái tổ hợp trong đệm mẫu LDS (Life Technologies) được chạy trên 10% gel NuPAGE bis-tris (đệm MES; 90 V, 105 phút) và được chuyển vào các màng nitroxenluloza để phân tích thâm tách Western.

TTR bị biến tính: TTR người tái tổ hợp được tạo ra như được mô tả trên đây cho TTR tự nhiên ngoại trừ đệm mẫu LDS chứa chất khử và các mẫu được làm biến tính bằng cách đun sôi trước SDS-PAGE.

Phân tích thâm tách Western

Các gel SDS-PAGE được thâm tách lên màng nitroxenluloza (iBlot, Life Technologies), được xử lý bằng đệm phong bế (LI-COR, Lincoln, NE) và được ủ trong 1,0- μg /mL kháng thể sơ cấp, được rửa với 1x TBS và được đưa vào dung dịch pha loãng 1:20.000 của kháng thể đề kháng kháng thể thứ cấp của thỏ hoặc của chuột được liên hợp IRDye 800CW (LI-COR, Lincoln, NE), sau đó được chụp ảnh trên máy chụp ảnh hồng ngoại Odyssey CLx (LI-COR, Lincoln, NE).

Kết quả và kết luận:

Phân tích thẩm tách Western về TTR tái tổ hợp tự nhiên so với bị biến tính (Fig. 1) chỉ ra rằng 18C5 có khả năng phản ứng rất yếu với các dạng TTR tự nhiên (Làn 1-3), nhưng có khả năng phản ứng rất mạnh với monome TTR biến tính (~15kDa) với khả năng phản ứng yếu hơn với dimer bị biến tính (~30kDa) (Làn 5-7). Làn 4 thể hiện chất đánh dấu khối lượng phân tử.

Ngược lại, kháng thể TTR thương mại (Sigma, Catalog No. HPA002550) không đặc hiệu cấu hình không phân biệt giữa TTR tự nhiên so với biến tính và thể hiện khả năng phản ứng rất mạnh đối với TTR tự nhiên và biến tính dạng monome cũng như dimer (Fig. 2). Làn 1-3 thể hiện các kết quả cho TTR tự nhiên; Làn 4 thể hiện các chất đánh dấu khối lượng phân tử, và Làn 5-7 thể hiện kết quả đối với TTR bị biến tính.

Ví dụ 7: Thiết kế các kháng thể 18C5 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu hoặc kháng thể cho để làm tương thích với người là kháng thể chuột 18C5. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của m18C5 trường thành được đề xuất là SEQ ID NO: 81. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của m18C5 trường thành được đề xuất là SEQ ID NO: 87. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 tổ hợp Kabat/Chothia chuỗi nặng được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO: 5, 7 và 9. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 Kabat chuỗi nhẹ được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO: 11, 13, và 15. Cách đánh số Kabat được sử dụng trong toàn bộ phần này.

Sự sắp xếp thẳng hàng các trình tự vùng biến đổi của 18C5 với các trình tự liên ứng của vùng biến đổi kháng thể từ Kabat, và *đồng tác giả* chỉ ra rằng vùng biến đổi chuỗi nặng (VH) của 18C5 thuộc phân nhóm VH chuột 3b, mà tương ứng với phân nhóm VH người 3. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ (VL) kappa của 18C5 thuộc phân nhóm Vk chuột 2, mà tương ứng với phân nhóm Vk người 2. [Kabat E.A., và đồng tác giả, (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, Xuất bản lần thứ năm Công bố NIH số 91-3242.].

Các gốc ở mặt phân cách giữa các vùng chức năng Vk và Vh là các gốc thường được tìm thấy, ngoại trừ Ala ở vị trí 37 trong chuỗi nặng, trong khi đó Val hoặc Ile thường ở vị trí này. Leu ở vị trí 95 trong Vh thường là Asp, Gly hoặc Ser. Các vị trí này là các ứng viên cho các đột biến ngược. Đối với chuỗi Vk, Glu 34 thường là Ala, His, Asn hoặc Ser,

và các vị trí này là các ứng viên cho các đột biến ngược.

Các CDR của 18C5 VH và VL được xác định bằng cách sử dụng các quy tắc xác định CDR dựa vào trình tự của Martin. Sau đó các CDR được phân vào các lớp chính tắc Chothia bằng cách sử dụng phân tổng kết các gốc quan trọng được thể hiện trong Bảng 3.5 của (MartinACR. (2010). Trong: Kontermann R và Diibel S (eds). *Antibody Engineering*. Heidelberg, Đức: Springer International Publishing AG.):

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

CDR-H2 bao gồm 17 axit amin và là tương tự với lớp chính tắc Chothia 3.

CDR-H3 bao gồm 4 axit amin; không có lớp nào cho CDR-H3.

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

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

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

Nghiên cứu được thực hiện trên các trình tự protein trong cơ sở dữ liệu PDB [Deshpande và đồng tác giả, 2005, *Nucleic Acids Research* 33:D233-D237] để tìm ra các cấu trúc, mà sẽ cung cấp mô hình cấu trúc thô của 18C5. Cấu trúc tinh thể của Fab kháng pyroglutamat-kháng thể Abeta chuột c#17 (mã PDB 5MYK) [Piechotta, A. và đồng tác giả (2017) *J. Biol. Chem.* 292: 12713-12724) được sử dụng cho cả cấu trúc Vh và Vk vì nó có độ phân giải tốt (1,6 Å) và tương đồng toàn bộ trình tự với 18C5 Vh và Vk, vẫn giữ lại cấu trúc chính tắc giống như vậy cho các vòng. Phần mềm Bioluminate được sử dụng để lập mô hình cấu trúc thô của 18C5. Phần mềm này được chuyển giao quyền sử dụng từ Schrodinger Inc.

Các khung của 18C5 VH và VL có chung mức độ tương đồng trình tự cao với các vùng tương ứng của PDB Crenezumab Fab (CreneFab) được làm tương thích với người: 5VZY, được thiết kế bởi Ultsch M, và đồng tác giả ((2016) *Sci Rep.*6:39374). Các vùng biến đổi của 18C5 và CreneFab cũng có chung độ dài giống nhau đối với các vòng CDR-H1, H2, L1, L2, và L3. Các vùng khung của CreneFab VH (5VZY-VH) và VL (5VZY-VL) được chọn làm trình tự nhận cho các CDR của 18C5. Phần mềm Bioluminate được sử dụng để lập mô hình cấu trúc này. Phần mềm này được chuyển giao quyền sử dụng từ Schrodinger Inc.

Các trình tự biến đổi chuỗi nặng và nhẹ thu được từ quá trình làm tương thích kháng thể với người được sắp xếp thẳng hàng tiếp với các trình tự dòng mầm của người bằng cách sử dụng công cụ IMGT Domain GapAlign để đánh giá tính chất người của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như được chỉ ra bởi hướng dẫn của hội đồng WHO INN. (WHO-INN: Tên chung quốc tế (International nonproprietary names: INN) cho các hợp chất sinh học và công nghệ sinh học (tổng quan) (Internet) 2014. Sẵn có từ: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>) Các gốc được thay đổi để sắp xếp thẳng hàng với trình tự dòng mầm của người tương ứng, nếu có thể, để làm tăng tính chất người. Đối với biến thể VL_v2 được làm tương thích với người, đột biến Q45R được đưa vào để làm cho trình tự này tương đồng hơn với gen dòng mầm của người IGKV2-30*02 (Số truy cập GenBank CAA77315; SEQ ID NO:90). Các trình tự axit amin chứa các khung CreneFab và CDR 18C5 được ký hiệu là hu18C5-VH_v1 và hu18C5-VL_v1.

Các dạng bổ sung của hu18C5-VH và hu18C5-VL được thiết kế để cho phép đánh giá nhiều gốc khung khác nhau về sự tham gia của chúng vào liên kết kháng nguyên và khả năng gây miễn dịch. Các vị trí được xem xét để gây đột biến bao gồm các vị trí mà:

- xác định các cấu hình CDR chính tắc (được tóm tắt trong Martin 2010),
- nằm trong vùng Vecnê (Foote J và Winter G. (1992). *J Mol Biol.* 224(2):487-99),
- khu trú vào mặt phân cách miền VH/VL (được tóm tắt trong Leger OJP và Saldanha J. (2000) Preparation of recombinant antibodies from immune rodent spleens and the design of their humanization by CDR grafting). Trong: Shepherd P và Dean C (eds). *Monoclonal Antibodies: a Practical Approach*. Oxford, UK: Oxford University Press),
- dễ xảy ra các biến đổi sau dịch mã, như glycosyl hóa hoặc pyroglutamin hóa,
- bị chiếm bởi các gốc được dự đoán là xung đột với các CDR, theo mô hình của CDR 18C5 được ghép lên các khung Crenezumab Fab, hoặc
- bị chiếm bởi các gốc hiếm trong số các kháng thể người được giải trình tự, tại đó gốc 18C5 mẹ của chuột hoặc một số gốc khác phổ biến hơn nhiều.

2 biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và 2 biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa các hoán vị khác

nhau của các đột biến thể: hu18C5-VH_v1 và hu18C5-VH_v2, (SEQ ID NO: 85-86, tương ứng) và hu18C5-VL_v1 và hu18C5-VL_v2_v6 (SEQ ID NO: 91-92, tương ứng). (Bảng 6 và 7). Các thiết kế Vk và Vh được làm tương thích với người điển hình, có các đột biến ngược và các đột biến khác dựa trên các khung người đã chọn, được thể hiện trong các Bảng 6 và 7, tương ứng. Các vùng được in đậm trong Bảng 6 và 7 thể hiện các CDR như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia. “-” chỉ ra không có axit amin ở vị trí đã chỉ ra. Các SEQ ID NO: 86 và 92 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong Bảng 8. Axit amin ở các vị trí trong hu18C5-VH_v1 và hu18C5-VH_v2 được liệt kê trong Bảng 9. Axit amin ở các vị trí trong hu18C5-VL_v1 và hu18C5-VL_v2 được liệt kê trong Bảng 10. Tỷ lệ phần trăm tính người cho các chuỗi VH được làm tương thích với người hu18C5-VH_v1, và hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO: 85-86, tương ứng) đối với gen dòng mầm người tương đồng nhất IGHV3-48*01, và cho các chuỗi VL được làm tương thích với người hu18C5-VL_v1 và hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO: 91-92, tương ứng) đối với gen dòng mầm người tương đồng nhất IGKV2-30*02, được chỉ ra trong Bảng 11.

Bảng 7. Các vùng 18C5 VL được làm tương thích với người

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	18C5 VL của chuột (SEQ ID NO: 87)	Trình tự nhận 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) Acc. # 5VZY (SEQ ID NO: 88)	hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO: 91)	hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO: 92)
1	1	Fr1	D	D	D	D
2	2	Fr1	V	I	I	V
3	3	Fr1	L	V	V	V
4	4	Fr1	M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L	L	L

10	10	Fr1	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	Fr1	P	P	P	P
13	13	Fr1	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	T	T	T
15	15	Fr1	L	P	P	P
16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	Fr1	D	E	E	E
18	18	Fr1	Q	P	P	P
19	19	Fr1	A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	R	R	R	R
25	25	CDR-L1	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q
28	27A	CDR-L1	S	S	S	S
29	27B	CDR-L1	I	L	I	I
30	27C	CDR-L1	V	V	V	V
31	27D	CDR-L1	D	Y	D	D
32	27E	CDR-L1	S	S	S	S
33	27F	CDR-L1		—	—	—
34	28	CDR-L1	N	N	N	N
35	29	CDR-L1	G	G	G	G
36	30	CDR-L1	N	D	N	N
37	31	CDR-L1	T	T	T	T
38	32	CDR-L1	Y	Y	Y	Y
39	33	CDR-L1	L	L	L	L
40	34	CDR-L1	E	H	E	E
41	35	Fr2	W	W	W	W
42	36	Fr2	Y	Y	Y	Y
43	37	Fr2	L	L	L	L
44	38	Fr2	Q	Q	Q	Q
45	39	Fr2	K	K	K	K
46	40	Fr2	P	P	P	P
47	41	Fr2	G	G	G	G
48	42	Fr2	Q	Q	Q	Q
49	43	Fr2	S	S	S	S
50	44	Fr2	P	P	P	P
51	45	Fr2	K	Q	Q	R

52	46	Fr2	L	L	L	L
53	47	Fr2	L	L	L	L
54	48	Fr2	I	I	I	I
55	49	Fr2	Y	Y	Y	Y
56	50	CDR-L2	K	K	K	K
57	51	CDR-L2	V	V	V	V
58	52	CDR-L2	S	S	S	S
59	53	CDR-L2	N	N	N	N
60	54	CDR-L2	R	R	R	R
61	55	CDR-L2	F	F	F	F
62	56	CDR-L2	S	S	S	S
63	57	Fr3	G	G	G	G
64	58	Fr3	V	V	V	V
65	59	Fr3	P	P	P	P
66	60	Fr3	D	D	D	D
67	61	Fr3	R	R	R	R
68	62	Fr3	F	F	F	F
69	63	Fr3	S	S	S	S
70	64	Fr3	G	G	G	G
71	65	Fr3	S	S	S	S
72	66	Fr3	G	G	G	G
73	67	Fr3	S	S	S	S
74	68	Fr3	G	G	G	G
75	69	Fr3	T	T	T	T
76	70	Fr3	D	D	D	D
77	71	Fr3	F	F	F	F
78	72	Fr3	T	T	T	T
79	73	Fr3	L	L	L	L
80	74	Fr3	K	K	K	K
81	75	Fr3	I	I	I	I
82	76	Fr3	S	S	S	S
83	77	Fr3	R	R	R	R
84	78	Fr3	V	V	V	V
85	79	Fr3	E	E	E	E
86	80	Fr3	A	A	A	A
87	81	Fr3	E	E	E	E
88	82	Fr3	D	D	D	D
89	83	Fr3	L	V	V	V
90	84	Fr3	G	G	G	G
91	85	Fr3	I	V	V	V
92	86	Fr3	Y	Y	Y	Y
93	87	Fr3	Y	Y	Y	Y

94	88	Fr3	C	C	C	C
95	89	CDR-L3	F	S	F	F
96	90	CDR-L3	Q	Q	Q	Q
97	91	CDR-L3	G	S	G	G
98	92	CDR-L3	S	T	S	S
99	93	CDR-L3	H	H	H	H
100	94	CDR-L3	V	V	V	V
101	95	CDR-L3	P	P	P	P
102	95A	CDR-L3	-	-	-	-
103	95B	CDR-L3	-	-	-	-
104	95C	CDR-L3	-	-	-	-
105	95D	CDR-L3	-	-	-	-
106	95E	CDR-L3	-	-	-	-
107	95F	CDR-L3	-	-	-	-
108	96	CDR-L3	L	W	L	L
109	97	CDR-L3	T	T	T	T
110	98	Fr4	F	F	F	F
111	99	Fr4	G	G	G	G
112	100	Fr4	A	Q	Q	Q
113	101	Fr4	G	G	G	G
114	102	Fr4	T	T	T	T
115	103	Fr4	K	K	K	K
116	104	Fr4	L	V	V	V
117	105	Fr4	E	E	E	E
118	106	Fr4	L	I	I	I
119	106A	Fr4	-	-	-	-
120	107	Fr4	K	K	K	K

Bảng 7. Các vùng 18C5 VH được làm tương thích với người

Gốc tuyến tính #	Gốc Kabat #	FR hoặc CDR	18C5 VH của chuột (SEQ ID NO: 99)	Trình tự nhận 5VZY-VH huFrwk (CreneFab) Acc. # 5VZY (SEQ ID NO:85)	hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:86)	hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)
------------------	-------------	-------------	-----------------------------------	--	-----------------------------	-----------------------------

1	1	Fr1	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V	V	V
3	3	Fr1	K	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L
5	5	Fr1	L	V	V	V
6	6	Fr1	E	E	E	E
7	7	Fr1	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G	G	G
9	9	Fr1	G	G	G	G
10	10	Fr1	G	G	G	G
11	11	Fr1	L	L	L	L
12	12	Fr1	V	V	V	V
13	13	Fr1	Q	Q	Q	Q
14	14	Fr1	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G
16	16	Fr1	G	G	G	G
17	17	Fr1	S	S	S	S
18	18	Fr1	L	L	L	L
19	19	Fr1	N	R	R	R
20	20	Fr1	L	L	L	L
21	21	Fr1	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C
23	23	Fr1	V	A	A	A
24	24	Fr1	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S

26	26	CDR-H1	G	G	G	G
27	27	CDR-H1	F	F	F	F
28	28	CDR-H1	D	T	D	D
29	29	CDR-H1	F	F	F	F
30	30	CDR-H1	S	S	S	S
31	31	CDR-H1	R	S	R	R
32	32	CDR-H1	F	Y	F	F
33	33	CDR-H1	W	G	W	W
34	34	CDR-H1	M	M	M	M
35	35	CDR-H1	S	S	S	S
36	35A	CDR-H1	—	—	—	—
37	35B	CDR-H1	—	—	—	—
38	36	Fr2	W	W	W	W
39	37	Fr2	A	V	V	A
40	38	Fr2	R	R	R	R
41	39	Fr2	Q	Q	Q	Q

42	40	Fr2	A	A	A	A
43	41	Fr2	P	P	P	P
44	42	Fr2	G	G	G	G
45	43	Fr2	R	K	K	K
46	44	Fr2	G	G	G	G
47	45	Fr2	Q	L	L	Q
48	46	Fr2	E	E	E	E
49	47	Fr2	W	L	L	W
50	48	Fr2	I	V	V	I
51	49	Fr2	G	A	A	G
52	50	CDR-H2	E	S	E	E
53	51	CDR-H2	I	I	I	I
54	52	CDR-H2	N	N	N	N
55	52A	CDR-H2	P	S	P	P
56	52B	CDR-H2	—	—	—	—
57	52C	CDR-H2	—	—	—	—
58	53	CDR-H2	G	N	G	G
59	54	CDR-H2	S	G	S	S
60	55	CDR-H2	S	G	S	S
61	56	CDR-H2	T	S	T	T
62	57	CDR-H2	I	T	I	I
63	58	CDR-H2	N	Y	N	N
64	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y
65	60	CDR-H2	T	P	T	T
66	61	CDR-H2	P	D	P	P
67	62	CDR-H2	S	S	S	S
68	63	CDR-H2	L	V	L	L
69	64	CDR-H2	K	K	K	K
70	65	CDR-H2	D	G	D	D
71	66	Fr3	K	R	R	R
72	67	Fr3	F	F	F	F
73	68	Fr3	I	T	T	T
74	69	Fr3	I	I	I	I
75	70	Fr3	S	S	S	S
76	71	Fr3	R	R	R	R
77	72	Fr3	D	D	D	D
78	73	Fr3	N	N	N	N
79	74	Fr3	A	A	A	A
80	75	Fr3	K	K	K	K
81	76	Fr3	N	N	N	N
82	77	Fr3	T	S	S	S
83	78	Fr3	L	L	L	L

84	79	Fr3	F	Y	Y	Y
85	80	Fr3	L	L	L	L
86	81	Fr3	Q	Q	Q	Q
87	82	Fr3	M	M	M	M
88	82A	Fr3	S	N	N	N
89	82B	Fr3	K	S	S	S
90	82C	Fr3	V	L	L	L
91	83	Fr3	R	R	R	R
92	84	Fr3	S	A	A	A
93	85	Fr3	E	E	E	E
94	86	Fr3	D	D	D	D
95	87	Fr3	S	T	T	T
96	88	Fr3	A	A	A	A
97	89	Fr3	L	V	V	V
98	90	Fr3	Y	Y	Y	Y
99	91	Fr3	Y	Y	Y	Y
100	92	Fr3	C	C	C	C
101	93	Fr3	A	A	A	A
102	94	Fr3	R	S	S	R
103	95	CDR-H3	L	G	L	L
104	96	CDR-H3	G	-	G	G
105	97	CDR-H3	Y	-	Y	Y
106	98	CDR-H3	G	-	G	G
107	99	CDR-H3	N	-	N	N
108	100	CDR-H3	Y	-	Y	Y
109	100A	CDR-H3	G	-	G	G
110	100B	CDR-H3	W	-	W	W
111	100C	CDR-H3	A	-	A	A
112	100D	CDR-H3	L	-	L	L
113	100E	CDR-H3	-	-	-	-
114	100F	CDR-H3	-	-	-	-
115	100G	CDR-H3	-	-	-	-
116	100H	CDR-H3	-	-	-	-
117	100I	CDR-H3	-	-	-	-
118	100J	CDR-H3	-	-	-	-
119	100K	CDR-H3	-	-	-	-
120	101	CDR-H3	D	D	D	D
121	102	CDR-H3	Y	Y	Y	Y
122	103	Fr4	W	W	W	W
123	104	Fr4	G	G	G	G

124	105	Fr4	Q	Q	Q	Q
125	106	Fr4	G	G	G	G
126	107	Fr4	T	T	T	T
127	108	Fr4	S	T	T	T
128	109	Fr4	V	V	V	V
129	110	Fr4	T	T	T	T
130	111	Fr4	V	V	V	V
131	112	Fr4	S	S	S	S
132	113	Fr4	S	S	S	S

Bảng 8:

Các đột biến ngược VH, VL và các đột biến khác cho 18C5 được làm tương thích với người

Biến thể VH hoặc VL	Trình tự nhận exon VH hoặc VL	Các thay đổi từ gốc khung nhận (dựa trên các CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	Trình tự nhận 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab) Acc. # 5VZY (SEQ ID NO:83)	Không có
hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	Trình tự nhận 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab) Acc. # 5VZY (SEQ ID NO:83)	H37, H45, H47, H48, H49, H94
hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	Trình tự nhận 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) Acc. # 5VZY (SEQ ID NO: 89)	không có
hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)	Trình tự nhận 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) Acc. # 5VZY (SEQ ID NO: 89)	L2, L45

Bảng 9:

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột

biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nặng của các kháng thể 18C5 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhận 5VZY-VH_huFrwk (CreneFab) Acc. # 5VZY (SEQ ID 18C5 VH của người (SEQ ID NO: 81)	hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)
H37	V	A	V
H45	L	Q	L
H47	L	W	L
H48	V	I	V
H49	A	G	A
H94	S	R	S

Bảng 10:

Đánh số Kabat các gốc khung (dựa vào các CDR tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nhẹ của các kháng thể 18C5 được làm tương thích với người

Gốc Kabat #	Trình tự nhận 5VZY-VL_huFrwk (CreneFab) Acc. # 5VZY (SEQ ID 18C5 VL chuột (SEQ ID NO:87)	hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO: 91)	hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)
-------------	--	------------------------------	-----------------------------

L2	I	V	I	V
L45	Q	K	Q	R

Bảng 11:

Tỉ lệ phần trăm tính chất người của chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể 18C5 được làm tương thích với người

Biến thể VH hoặc VL	% Tính chất người
hu18C5-VH_v1 (SEQ ID NO:85)	96,2%
hu18C5-VH_v2 (SEQ ID NO:86)	93,8%
hu18C5-VL_v1 (SEQ ID NO:91)	88,6%
hu18C5-VL_v2 (SEQ ID NO:92)	92,4%

Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc lớp Chothia, gốc Vernier, hoặc gốc ở mặt phân cách/gói khác nhau giữa các trình tự nhận của chuột và người là các ứng viên cho sự thể. Ví dụ về các gốc chính tắc lớp Chothia bao gồm gốc Kabat H48 trong Bảng 6 và 7. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/gói (VH+VL) bao gồm các gốc Kabat H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96, và L98 trong Bảng 6 và 7.

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

I2V là đột biến ngược của gốc chính tắc Chothia.

Q45R là đột biến thành gốc dòng phôi IGKV2-30*02. Q là hiếm ở người ở vị trí này, R thường thấy ở vị trí này.

hu18C5-VL_v1: Các vòng CDR-L1, L2, và L3 của 18C5-VL được ghép lên khung của CreneFab (5VZY-VL).

hu18C5-VL_v2: khôi phục tất cả các đột biến thể khung ở các vị trí mà quan trọng đối với việc xác định các lớp chính tắc Chothia, là một phần của vùng Vernier, hoặc được đặt ở mặt phân cách vùng chức năng VH/VL; hu18C5-VL_v2 kết hợp các đột biến ngược

I2V và trình tự nhận của người vào đột biến dòng mầm Q45R, để cho phép đánh giá sự đóng góp của các vị trí này vào ái lực liên kết kháng nguyên và khả năng gây miễn dịch.

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ:

hu18C5-VL_1 (SEQ ID NO: 91)

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLL
IYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGT
KVEIK

hu18C5-VL_2 (SEQ ID NO: 92)

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPRL
LIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQG
TKVEIK

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

V37A: là đột biến ngược trong vùng vernier. Val thể hiện tương tác đẩy với Trp47.

L45Q: là đột biến ngược của gốc mặt phân cách lõi theo Chothia. Leu ở vị trí này có các tương tác đẩy Van der Waals.

L47W: là đột biến ngược của gốc mặt phân cách. Ở 18C5 của chuột Trp ở vị trí 47 và Trp tạo liên kết hydro với Ser 35 nhờ đó làm ổn định các phiến beta trong chuỗi. Leu không tạo ra mặt phân cách bất kỳ với gốc bất kỳ và có thể làm mất ổn định cấu hình.

V48L là đột biến ngược của gốc vùng Vernier tương tác CDR để bảo tồn tương tác này.

A49G: là đột biến ngược của gốc vùng Vernier.

S94R: là đột biến ngược của gốc vùng Vernier, để bảo tồn tương tác CDR.

hu18C5-VH_v1: Các vòng CDR-H1, H2, và H3 của 18C5-VH được ghép lên khung của CreneFab VH (5VZY-VH).

Hu18C5-VH_v2: khôi phục tất cả các đột biến thể khung ở các vị trí quan trọng đối với việc xác định các lớp chính tắc Chothia, là một phần của vùng Vernier, hoặc được đặt

ở mặt phân cách vùng chức năng VH/VL. 18C5-VH_v2 kết hợp các đột biến ngược V37A, L45Q, L47W, V48I, A49G và

S94R, để cho phép đánh giá sự đóng góp của các vị trí này vào ái lực liên kết kháng nguyên và khả năng gây miễn dịch.

Vùng biến đổi chuỗi nặng:

hu18C5-VH_1 (SEQ ID NO: 85)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRFWMSWVRQAPGKGLELVA
EINPGSSTINYTPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGYGNY
GWALDYWGQGT T VTVSS

hu18C5-VH_2 (SEQ ID NO: 86)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDLSRFWMSWARQAPGKGQEWIG
EINPGSSTINYTPSLKDRFTISRDNANKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGNY
GWALDYWGQGT T VTVSS

Danh mục trình tự:

SEQ ID NO: 1

Trình tự axit amin 18C5 VH với peptit tín hiệu

MDFGLIFFIVALLKGVQCEVKLLESGGGLVQPGGSLNLSVASGFDLSRFW
MSWARQAPGRGQEWIGEINPGSSTINYTPSLKDKFIISRDNANKNTLFLQMSKVRS
EDSALYYCARLGY GNYGWALDYWGQGT SVTVSS

SEQ ID NO:2

Trình tự nucleotit mã hóa 18C5 VH chuột với peptit tín hiệu

ATGGATTTTGGGCTGATTTTTTTCATTGTTGCCCTTTTAAAAGGGGTCC
AGTGTGAGGTAAAGCTTCTCGAGTCTGGAGGTGGCCTGGTGCAGCCTGGAGG
ATCCCTGAATCTCTCCTGTGTAGCCTCAGGATTCGATTTTAGTAGATTCTGGA
TGAGTTGGGCTCGGCAGGCTCCAGGGAGAGGACAGGAATGGATTGGAGAGA
TTAATCCAGGAAGCAGTACGATAAACTATACGCCATCTCTGAAGGATAAATT
CATCATCTCCAGAGACAACGCCAAAAATACGCTGTTTCCTGCAAATGAGCAAA
GTGAGATCTGAGGACTCAGCCCTTTATTACTGTGCAAGACTGGGGTATGGTA

ACTACGGATGGGCTCTGGACTACTGGGGTCAAGGAACCTCAG
TCACCGTCTCCTCA

SEQ ID NO:3

Trình tự axit amin 18C5 VL với peptit tín hiệu

MKLPVRLLVLMFWIPASRSDVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVDS
NGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAED
LGIYYCFQGSHVPLT FGAGTKLELK

SEQ ID NO:4

trình tự nucleotit mã hóa 18C5 VL chuột với peptit tín hiệu

ATGAAGTTGCCTGTTAGGCTGTTGGTGCTGATGTTCTGGATTCCTGCTTCCAG
AAGTGATGTTTTGATGACCCAAACTCCACTCTCCCTGCCTGTCAGTCTTGGAG
ATCAAGCCTCCATCTCTTGCAGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGA
AACACCTATTTAGAATGGTACCTGCAGAAACCAGGCCAGTCTCCAAAGCTCC
TGATCTACAAAGTTTCCAACCGATTTTCTGGGGTCCCAGACAGGTTCAGTGGC
AGTGGATCAGGGACAGATTTCACTCAAGATCAGCAGAGTGGAGGCTGAG
GATCTGGGAATTTATTACTGCTTTCAAGGTTACATGTTCCGCTCACGTTCCG
TGCTGGGACCAAGTTGGAGCTGAAA

SEQ ID NO: 5

trình tự axit amin của 18C5 CDR-H1

GFDFSFRFWMS

SEQ ID NO: 6

trình tự axit nucleic mã hóa 18C5 CDR-H1

GGATTCGATTTTAGTAGATTCTGGATGAGT

SEQ ID NO: 7

trình tự axit amin của 18C5 CDR-H2

EINPGSSTINYTPSLKD

SEQ ID NO: 8

trình tự axit nucleic mã hóa 18C5 CDR-H2

GAGATTAATCCAGGAAGCAGTACGATAAACTATACGCCATCTCTGAAGGAT

SEQ ID NO: 9

trình tự axit amin của 18C5 CDR-H3

LGYGNYGWALDY

SEQ ID NO: 10

trình tự axit nucleic mã hóa 18C5 CDR-H3

CTGGGGTATGGTAACTACGGATGGGCTCTGGACTAC

SEQ ID NO: 11

trình tự axit amin của 18C5 CDR-L1

RSSQSIVDSNGNTYLE

SEQ ID NO: 12

trình tự axit nucleic mã hóa 18C5 CDR-L1

AGATCTAGTCAGAGCATTGTAGATAGTAATGGAAACACCTATTTAGAA

SEQ ID NO: 13

trình tự axit amin của 18C5 CDR-L2

KVSNRFS

SEQ ID NO: 14

trình tự axit nucleic mã hóa 18C5 CDR-L2

AAAGTTTCCAACCGATTTTCT

SEQ ID NO: 15

trình tự axit amin của 18C5 CDR-L3

FQGSHVPLT

SEQ ID NO: 16

trình tự axit nucleic mã hóa 18C5 CDR-L3

TTTCAAGGTTTCACATGTTCCGCTCACG

SEQ ID NO: 17

trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng 18C5 khảm (IgG1 người)

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVF
SCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 18

axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng 18C5 khảm (IgG1 người)

GCCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC
CTCTGGGGGACACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCGTGGAACCTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGACACACCT
TCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
AAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTC
AGTCTTCCTCTTCCCCC AAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCGTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACGCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACA ACTACAAGACCACGC
CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCTCTATAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG

AGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAATGA

SEQ ID NO: 19

trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ 18C5 khảm (kappa người)

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO: 20

trình tự axit nucleic mã hóa trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ 18C5 khảm (kappa người)

CGGGGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCA
GTTGAAATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCA
GAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTC
CCAGGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAG
CAGCACCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGC
CTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAAC
AGGGGAGAGTGTTAG

SEQ ID NO:21

trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 được lấy làm ví dụ

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNVKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

SEQ ID NO:22

trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 G1m3 được lấy làm ví dụ

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTQSWNSGALTSGVHTFPA

VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKTHTCP
PCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGV
EVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTI
SKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENN
YKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQKSLSLS
PGK

SEQ ID NO:23

trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 G1m3 được lấy làm ví dụ

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPTVSWNSGALTSGVH
TFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPKSCDKT
HTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWY
VDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNG
QPENNYKTTTPVLDSGDSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSVCSVMHEALHNHYTQ
KSLSLSPGK

SEQ ID NO: 24

trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ có Arginin
đầu cùng N

RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQE
SVTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:25

trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ không có
Arginin đầu cùng N

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES
VTEQDSKDYSLSSSTLTLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

SEQ ID NO:26

trình tự axit amin của transthyretin người được chỉ ra bằng số truy cập P02766.1
(UniProt)

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDVAVRGSPAINVAVHVFR
KAADDTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHE
HAEVVFTANDS GPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:27

trình tự axit amin của transthyretin người được chỉ ra bằng số truy cập AAB35639.1
(GenBank)

GPTGTGESKCPLMVKVLDVAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGE
LHGLTTEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAAL
LSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:28

trình tự axit amin của transthyretin người được chỉ ra bằng số truy cập AAB3 5640.1
(GenBank)

GPTGTGESKCPLMVKVLDVAVRGSPAINVAVHVFRKAADDTWEPFASGKTSESGE
LHGLTTEEQFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAAL
LSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:29

trình tự axit amin của transthyretin người được chỉ ra bằng số truy cập ABI63351.1
(GenBank)

MASHRLLLLCLAGLVFVSEAGPTGTGESKCPLMVKVLDVAVRGSPAINVAVHVFR
KAADDTWEPFASGKTSESGELHGLTTEEEFVEGIYKVEIDTKSYWKALGISPFHE
HAEVVFTANDS GPRRYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:30

trình tự axit amin của các gốc 101-109 của transthyretin người

GPRRYTIAA

SEQ ID NO:31

trình tự axit amin của các gốc 87-127 của transthyretin người

FHEHAEVVFTANDSGPRRYTIAALLSPYSYSTTAVVTNPKE

SEQ ID NO:32

trình tự axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 G1m3 được lấy làm ví dụ

GCCTCCACCAAGGGTCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCCTCCTCCAAGAGCAC
CTCTGGGGGGCACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAA
CCGGTGACGGTGTCTGTGGAAGTCAAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCT
TCCCCGGCTGTCTACAGTCCTCAGGACTCTACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACC
GTGCCCTCCAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGCAACGTGAATCACA
AGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAGAGTTGAGCCCAAATCTTGTGACA
AAACTCACACATGCCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGGACCGTC
AGTCTTCCTCTTCCCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCCTCATGATCTCCCGGACCC
CTGAGGTCACATGCGTGGTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCCTGAGGTCAA
GTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGAGGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCG
CGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCAGCGTCCTCACCCTCC
TGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCCAACAA
AGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCC
CGAGAACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAGGAGATGACCAAG
AACCAGGTCAGCCTGACCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCG
CCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAGCCGGAGAACAACACTACAAGACCACGC
CTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTATAGCAAGCTCACCGTG
GACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGATGCATG
AGGCTCTGCACAACCACTACACGCA
GAAGAGCCTCTCCCTGTCCCCGGGTAAA

SEQ ID NO: 33

trình tự axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ có Arginin đầu cùng N

CGAACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTT
GAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAG
AGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCA
GGAGAGTGTACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAG

CACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGC
GAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGG
GAGAGTGT

SEQ ID NO:34

trình tự axit nucleic mã hóa vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ không có
Arginin đầu cùng N

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAA
ATCTGGAAGTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGG
CCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGA
GAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCAC
CCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACACAAAGTCTACGCCTGCGA
AGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGA
GAGTGT

SEQ ID NO:35

trình tự axit amin của peptit tín hiệu vùng hằng định chuỗi nặng

MNFGLSLIFLVLVLKGVQC

SEQ ID NO:36

trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu vùng hằng định chuỗi nặng

ATGAACTTTGGGCTCAGCTTGATTTTCCTTGTCTTGTTTAAAAGGTGTCCAG
TGT

SEQ ID NO:37

trình tự axit amin của peptit tín hiệu vùng hằng định chuỗi nhẹ

MESHTQVFVFLWLSGVDG

SEQ ID NO:38

trình tự axit nucleic mã hóa peptit tín hiệu vùng hằng định chuỗi nhẹ

ATGGAGTCACATACTCAGGTCTTTGTATTCGTGTTTCTCTGGTTGTCTGGTGT
GACGGA

SEQ ID NO: 39

trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của 14G8

SYTMS

SEQ ID NO: 40

trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của 14G8

EINNSGDTTYYPDTVKG

SEQ ID NO: 41

trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của 14G8

HYYYGGGYGGWFFDV

SEQ ID NO: 42

trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của 14G8

RSNKSLLSNGNTYLY

SEQ ID NO: 43

trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của 14G8

RVSNLAS

SEQ ID NO: 44

trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của 14G8

MQHLEYPLT

SEQ ID NO: 45

epitop của 5A1

EHAENVFTA

SEQ ID NO: 46

trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của 5A1

NYAMS

SEQ ID NO: 47

trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của 5A1

SISSGGSTYYPDVKG

SEQ ID NO: 48

trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của 5A1

YYYGQYFDF

SEQ ID NO: 49

trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của 5A1

KASQDVSTTVA

SEQ ID NO: 50

trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của 5A1

SASYRCT

SEQ ID NO: 51

trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của 5A1

QQHYSTPLT

SEQ ID NO: 52

trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của 6C1

NYYMS

SEQ ID NO: 53

trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của 6C1

YISIDGNNIYHPDSVKG

SEQ ID NO: 54

trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của 6C1

DSDYGYFDV

SEQ ID NO: 55

trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của 6C1

RSSQSIVHSNGNTYLE

SEQ ID NO: 56

trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của 6C1

KVSKRFS

SEQ ID NO: 57

trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của 6C1

FQGSHVPLT

SEQ ID NO: 58

trình tự axit amin của vùng VH của AD7F6

EVQLVESGGDLVKPGGSLKLSAASGFTFSNYGMSWIRQTPDKRLEWVATISSS
GTYYTYTESVKGRFTVSRDNAKNTLSLQMSNLKSDDTAMYYCTRQAYGREYFD
VWGTGTTVTVSSAKTTPPSVYPLAPGCGDTTGSSVTLGCLVKGYFPESVTVTN
SGSLSSSVHTFPALLQSGLYTMSSSVTVPSSTWPSQTVTCVAHPASSTTVDKKLE
PSGPISTINPCPPCKECHKCPAPNLEGGPSVFIFPPNIKDVLMSLTPKVTCVVVDVS
EDDPDVRIWFVNNVEVHTAQTQTHREDYNSTIRVVSALPIQHQQDWMSGKEFKC
KVNNKDLPSPIERTISKIKGLVRAPQVYILPPPAEQLSRKDVSLTCLVVGFNPGDIS
VEWTSNGHTEENYKDTAPVLDSGYSYFIYSKLDIKTSTVGENRFLMQRETRGSE
KLLPEEDHLPSPGK

SEQ ID NO: 59

trình tự axit amin của vùng VL của AD7F6

DIVMSQSPSSLAVSAGEKVTMSCKSSQSLFDSRTRKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASNRESGVDPDRFIGSGSGTDFLTISVQAEDLAVYFCKQSNYLRTFGGGTRVE
IKRADAAPTVSIFPPSSEQLTSGGASVVCFLNFFYPKDINVKWKIDGSERQNGVL
NSWTDQDSKSTYSMSSTLTLTKEDEYERHNSYTCEATHKTSTSPIVKSFNRNEC

SEQ ID NO: 60

trình tự axit amin của CDR-H1 của RT24

RYWIT

SEQ ID NO: 61

trình tự axit amin của CDR-H2 của RT24

DIYPGSGRTNYNEKFKN

SEQ ID NO: 62

trình tự axit amin của CDR-H3 của RT24

YYGSTYFYV

SEQ ID NO: 63

trình tự axit amin của CDR-L1 của RT24

RSSKSLLYKDGKTYLN

SEQ ID NO: 64

trình tự axit amin của CDR-L2 của RT24

LMSTRAS

SEQ ID NO: 65

trình tự axit amin của CDR-L3 của RT24

QQLVEYPRT

SEQ ID NO: 66

trình tự axit amin của CDR-H1 của NI-301.35G11

SYAMS

SEQ ID NO: 67

trình tự axit amin của CDR-H2 của NI-301.35G11

SISGSGDTTKYTDSVKG

SEQ ID NO: 68

trình tự axit amin của CDR-H3 của NI-301.35G11

DGSGRIDPFAL

SEQ ID NO: 69

trình tự axit amin của CDR-L1 của NI-301.35G11

RSSRSLVYSDGNIYLN

SEQ ID NO: 70

trình tự axit amin của CDR-L2 của NI-301.35G11

KVSNRDSG

SEQ ID NO: 71

trình tự axit amin của CDR-L3 của NI-301.35G11

MQGTHWPRT

SEQ ID NO: 72

epitop của MFD101, MFD102, MFD103, MFD105,

ADDTWEPFASGKT

SEQ ID NO: 73

epitop của MFD107, MFD108, MFD109, MFD111

TSESGELHGLTTE

SEQ ID NO: 74

epitop của MFD114

ALLSPYSYSTTAV

SEQ ID NO: 75

trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 9D5

SYTMS

SEQ ID NO: 76

trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 9D5

EISNSGDTTYYPDTVKG

SEQ ID NO: 77

trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 9D5

HYYYGGGYGGWFFDV

SEQ ID NO: 78

trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 9D5

RSSKSLLSNGNTYLY

SEQ ID NO: 79

trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 9D5

RVSNLAS

SEQ ID NO: 80

trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 9D5

MQHLEYPLT

SEQ ID NO: 81

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của kháng thể 18C5 của chuột

EVKLLES GGGLVQPGGSLNLSCVASGFDFSRFWMSWARQAPGRGQEWIGEINPG
SSTINYTPSLKDKFIISRDNAKNTLFLQMSKVRSEDSALYYCARLGYGNYGWALD
YWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 82

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của Fab chuột kháng pyroglutamat-
kháng thể Abeta c#17

EVKLVES GGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSDYGMAWVRQAPGKGPEWVAFISN
LAYSIIYADTVTGRFTISRENAKNTLYLEMSSLRSEDAMYYCARYDYNILDY
VMDYWGQGTSVTVSS

SEQ ID NO: 83

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của PDB Crenezumab Fab
(CreneFab) được làm tương thích với người: 5VZY

EVQLVES GGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYGMSWVRQAPGKGLELVASINSN

GGSTYYPD SVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASGDYWGQGT
VTVSS

SEQ ID NO: 84

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của trình tự dòng mầm của người
IGHV3-48*01

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYSMNWVRQAPGKGLEWVSYISS
SSTIYYADSVKGRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARYFDYWGQGT
LTVSS

SEQ ID NO: 85

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 18C5 được làm tương
thích với người hu18C5-VH_1

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRFWMSWVRQAPGKGLELVAEINPG
SSTINYTPSLKDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCASLGYGNYGWAL
DYWGQGT TVTVSS

SEQ ID NO: 86

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 18C5 được làm tương
thích với người hu18C5-VH_2

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFDFSRFWMSWARQAPGKGQEWIGEINPG
SSTINYTPSLKDRFTISRDN AKNSLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLGYGNYGWAL
DYWGQGT TVTVSS

SEQ ID NO:87

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của kháng thể 18C5 của
chuột

DVLMTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGV PDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGIYYCFQGSHVPLTFGAGTKLEL
K

SEQ ID NO: 88

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của Fab kháng pyroglutamat-kháng thể Abeta chuột c#17

DVVMQTQTPLSLPVSLGDQASISCRSSQSLVHSDGNTYLHWYLQKPGQSPKLLIYK
VSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYFCSQSTHVPPTFGGGGTKLEI
K

SEQ ID NO: 89

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của PDB Crenezumab Fab (CreneFab) được làm tương thích với người: 5VZY

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLVYSNGDTYLHWYLQKPGQSPQLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCSQSTHVPWTFGQGGTKVEI
K

SEQ ID NO: 90

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của trình tự dòng mầm của người IGKV2-30*2

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRRLIYK
VSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHTWPWTFGQGGTK
VEIK

SEQ ID NO: 91

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 18C5 được làm tương thích với người hu18C5-VL_1

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPQLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGGTKVEI
K

SEQ ID NO: 92

trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 18C5 được làm tương thích với người hu18C5-VL_2

DVVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSIVDSNGNTYLEWYLQKPGQSPRLLIYKV
SNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCFQGSHVPLTFGQGGTKVEI

SEQ ID NO: 101

trình tự axit amin của CDR-L2 Contact của kháng thể 18C5 của chuột

LLIYKVSNRF

SEQ ID NO: 102

trình tự axit amin của CDR-L3 Contact của kháng thể 18C5 của chuột

FQGSHVPL

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập liên kết vào transthyretin (TTR) người chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 81 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 87.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó ba CDR chuỗi nặng là như được định nghĩa bởi tổ hợp Kabat/Chothia (các SEQ ID NO: 5, 7, và 9) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được định nghĩa bởi tổ hợp Kabat/Chothia (các SEQ ID NO: 11, 13, và 15).
3. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người hoặc kháng thể được ngụ trang.
4. Kháng thể theo điểm 3, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người.
5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này có isotyp IgG1 của người hoặc kháng thể này có isotyp IgG2 hoặc IgG4 của người.
6. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 4, trong đó các CDR này là theo định nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact.
7. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 6, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng tổ hợp Kabat/Chothia có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 5, 7, và 9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ tổ hợp Kabat/Chothia có trình tự nêu trong các SEQ ID NO: 11, 13, và 15.
8. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 6, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat có trình tự nêu trong SEQ ID NO:93, SEQ ID NO:7, và SEQ ID NO:9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Kabat có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:13, và SEQ ID NO: 15.
9. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 6, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Chothia

có trình tự nêu trong SEQ ID NO:94, SEQ ID NO:96, và SEQ ID NO:9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Chothia có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO:13, và SEQ ID NO: 15.

10. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 6, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM có trình tự nêu trong SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:97, và SEQ ID NO:9 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ AbM có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 15.

11. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 6, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact có trình tự nêu trong SEQ ID NO:95, SEQ ID NO:98, và SEQ ID NO:99 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:100-102.

12. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 4, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 85-86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 91-92.

13. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 12, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H37 bị chiếm bởi V hoặc A, H45 bị chiếm bởi L hoặc Q, H47 bị chiếm bởi L hoặc W, H48 bị chiếm bởi V hoặc I, H49 bị chiếm bởi A hoặc G, và H94 bị chiếm bởi S hoặc R.

14. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 13, với điều kiện là các vị trí H37, H45, H47, H48, H49, và H94 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A, Q, W, I, G, và R.

15. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 12, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 bị chiếm bởi I hoặc V và L45 bị chiếm bởi Q hoặc R.

16. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 15, với điều kiện là các vị trí

L2 và L45 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V và R.

17. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 12, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 85-86 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các SEQ ID NO: 91-92.

18. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể nguyên vẹn.

19. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là đoạn liên kết.

20. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 4, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng.

21. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 20, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này là dạng đột biến của vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người mà có khả năng liên kết với thụ thể Fcγ giảm so với vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người.

22. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 20, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:22 có hoặc không có lysin đầu tận cùng C và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:24.

23. Dược phẩm chứa kháng thể thứ nhất theo điểm 1, kháng thể thứ hai và chất mang được dung, trong đó kháng thể thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm:

kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:75-77 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:78-80;

kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:39-41 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:42-44;

kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:46-48 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:49-51;

kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:52-54 và

ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:55-57;

kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:58 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:59;

kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:60-62 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:63-65; và

kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:66-68 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:69-71.

24. Kháng thể đặc hiệu kép chứa hai vùng chức năng liên kết kháng nguyên, vùng chức năng liên kết kháng nguyên thứ nhất chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:81 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:87 và vùng chức năng liên kết kháng nguyên thứ hai, trong đó vùng chức năng liên kết kháng nguyên thứ hai được chọn từ nhóm bao gồm:

vùng chức năng liên kết kháng nguyên chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:75-77 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:78-80;

vùng chức năng liên kết kháng nguyên chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:39-41 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:42-44;

vùng chức năng liên kết kháng nguyên chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:46-48 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:49-51;

vùng chức năng liên kết kháng nguyên chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:52-54 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:55-57;

vùng chức năng liên kết kháng nguyên chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:58 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO:59;

vùng chức năng liên kết kháng nguyên chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:60-62 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:63-

65; và

vùng chức năng liên kết kháng nguyên chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:66-68 và ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong các SEQ ID NO:69-71.

25. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 1 và chất mang dược dụng.

26. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể như được mô tả trong điểm 1.

27. Vector biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic theo điểm 26.

28. Tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện tái tổ hợp theo điểm 27.

29. Phương pháp làm cho kháng thể chuột tương thích với người, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) chọn một hoặc nhiều trình tự của kháng thể nhận của người;

(b) xác định các gốc axit amin của kháng thể chuột cần được giữ lại;

(c) tổng hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nặng kháng thể chuột và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nhẹ kháng thể chuột; và

(d) biểu hiện các axit nucleic này trong tế bào chủ để sản sinh ra kháng thể được làm tương thích với người;

trong đó kháng thể chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:81 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:87.

30. Phương pháp tạo ra kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được ngụy trang, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) nuôi cấy các tế bào đã được biến nạp các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể, nhờ đó các tế bào tiết ra kháng thể này; và

(b) tinh chế kháng thể này từ môi trường nuôi cấy tế bào;

trong đó kháng thể này là dạng được làm tương thích với người, dạng khảm hoặc

dạng được nguy trang của kháng thể chuột khác biệt ở chỗ vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 81 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 87.

31. Phương pháp tạo ra dòng tế bào sản sinh kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được nguy trang, phương pháp này bao gồm các bước:

(a) đưa vector mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể này và gen đánh dấu chọn lọc được vào các tế bào;

(b) nhân giống các tế bào này trong các điều kiện để chọn lọc các tế bào có số lượng bản sao vector gia tăng;

(c) phân lập các tế bào đơn từ các tế bào được chọn lọc; và

(d) tạo ngân hàng tế bào được tách dòng từ tế bào đơn được chọn lọc dựa vào hiệu suất kháng thể;

trong đó kháng thể này là dạng được làm tương thích với người, dạng khảm hoặc dạng được nguy trang của kháng thể chuột khác biệt ở chỗ vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 81 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 87.

32. Phương pháp theo điểm 31, trong đó phương pháp này còn bao gồm bước nhân giống các tế bào này trong các điều kiện chọn lọc và sàng lọc các dòng tế bào biểu hiện và tiết tự nhiên ít nhất là 100 mg/L/10⁶ tế bào/24 giờ.

1/3

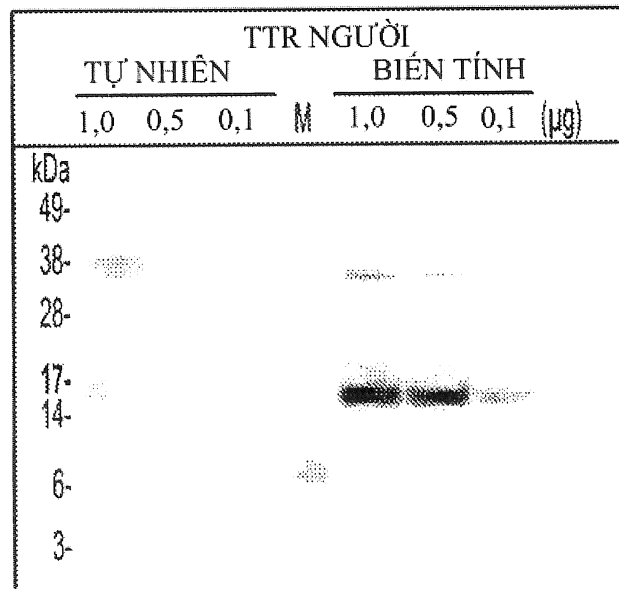


FIG. 1

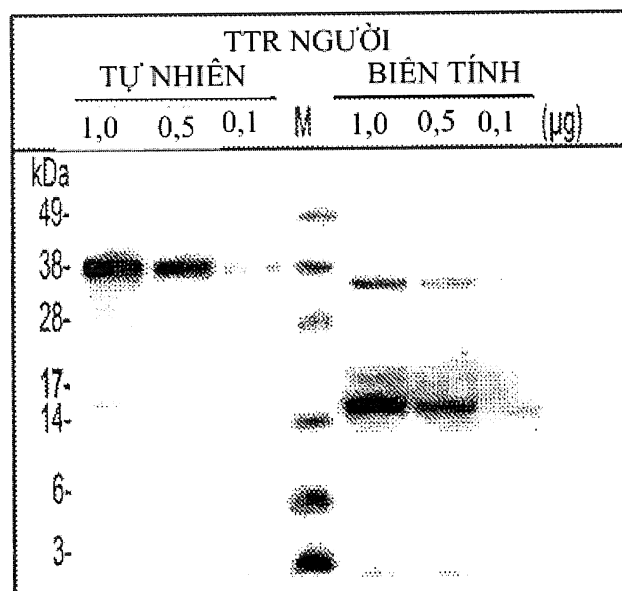


FIG. 2

2/3

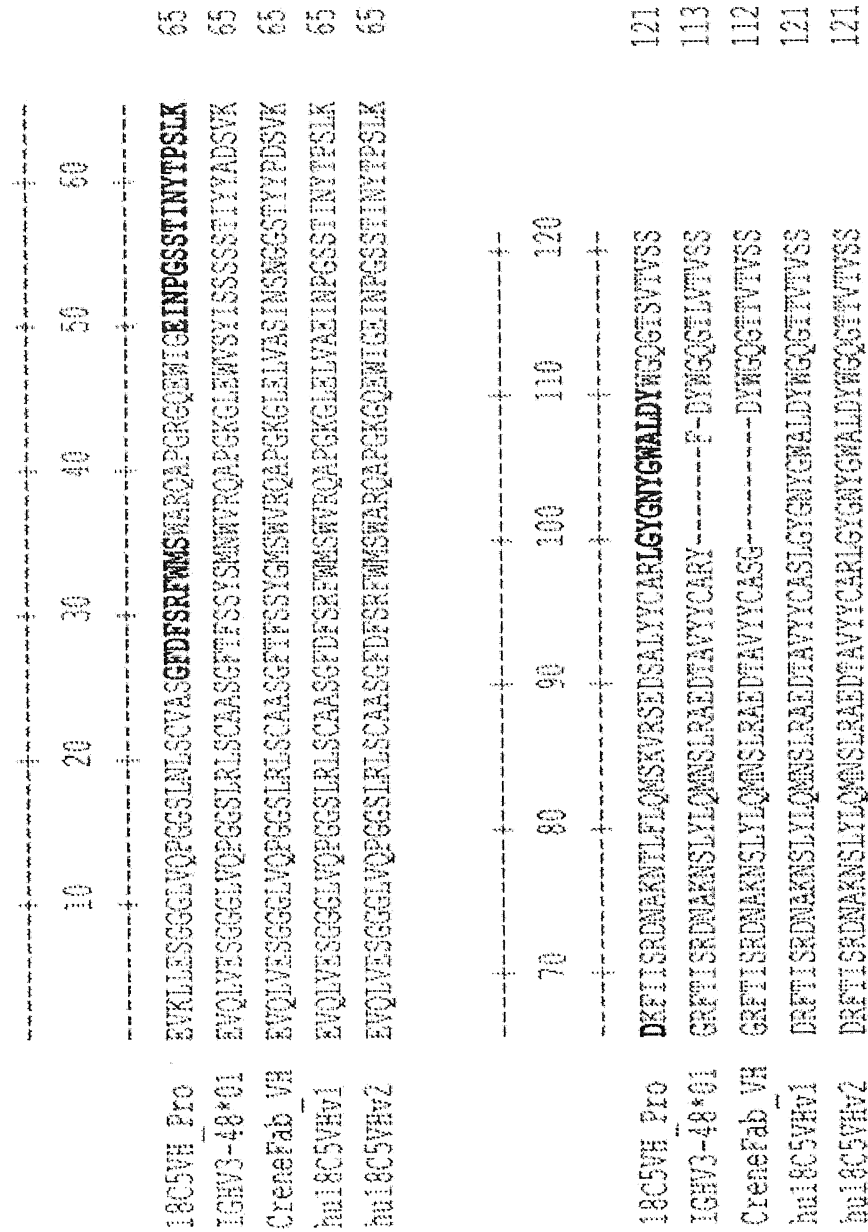


FIG. 3

	10	20	30	40	50	60	
18C5VL_pro	DVMTQPSLSL	PVSLGQASIS	CRSSQSI	VDNSGNTYLE	HWYLOK	PQGSFKLLIYKVS	NRF
IGKV2-30*02	DVMTQPSLSL	PVTLGQASIS	CRSSQSI	VHSDGNTYLE	HWYLOK	PQGSFKLLIYKVS	NRF
crenefab-VL	DVMTQPSLSL	PVTFGEFASIS	CRSSQSI	VSNGDTYLE	HWYLOK	PQGSFKLLIYKVS	NRF
hu18C5VLv1	DVMTQPSLSL	PVTFGEFASIS	CRSSQSI	VDNSGNTYLE	HWYLOK	PQGSFKLLIYKVS	NRF
hu18C5VLv2	DVMTQPSLSL	PVTFGEFASIS	CRSSQSI	VDNSGNTYLE	HWYLOK	PQGSFKLLIYKVS	NRF
18C5VL_pro	SGVPLDRFSS	SGSGTDFILKIS	RVREAE	DLGLIYCFQGS	SHVPLTFGAG	KVLEIK	
IGKV2-30*02	SGVPLDRFSS	SGSGTDFILKIS	RVREAE	DGVVYCMQGT	HWPLTFGQGV	KVLEIK	
crenefab-VL	SGVPLDRFSS	SGSGTDFILKIS	RVREAE	DGVVYCSQST	HWPLTFGQGV	KVLEIK	
hu18C5VLv1	SGVPLDRFSS	SGSGTDFILKIS	RVREAE	DGVVYCFQGS	SHVPLTFGQGV	KVLEIK	
hu18C5VLv2	SGVPLDRFSS	SGSGTDFILKIS	RVREAE	DGVVYCFQGS	SHVPLTFGQGV	KVLEIK	

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> PROTHENA BIOSCIENCES, INC.
 SALMANS, JOSHUA R.
 ALEXANDER, SVETLANA
 BARBOUR, ROBIN
 HIGAKI, JEFFREY N.
 NIJJAR, TARLOCHAN

<120> KHÁNG THỂ ĐƠN DÒNG ĐƯỢC PHÂN LẬP LIÊN KẾT VÀO TRANSTHYRETIN VÀ ĐƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> 057450-516711

<150> US 62/569,436

<151> 06-10-2017

<150> US 62/598,965

<151> 14-12-2017

<160> 102

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 139

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 1

Met Asp Phe Gly Leu Ile Phe Phe Ile Val Ala Leu Leu Lys Gly Val
 1 5 10 15
 Gln Cys Glu Val Lys Leu Leu Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro
 20 25 30
 Gly Gly Ser Leu Asn Leu Ser Cys Val Ala Ser Gly Phe Asp Phe Ser
 35 40 45
 Arg Phe Trp Met Ser Trp Ala Arg Gln Ala Pro Gly Arg Gly Gln Glu
 50 55 60
 Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro
 65 70 75 80
 Ser Leu Lys Asp Lys Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr
 85 90 95
 Leu Phe Leu Gln Met Ser Lys Val Arg Ser Glu Asp Ser Ala Leu Tyr
 100 105 110
 Tyr Cys Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp Tyr
 115 120 125
 Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
 130 135

<210> 2

<211> 417

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 2

atggattttg ggctgatttt tttcattggt gcccttttaa aaggggtcca gtgtgaggta 60
 aagcttctcg agtctggagg tggcctgggt cagcctggag gatccctgaa tctctcctgt 120
 gtagcctcag gattcgattt tagtagattc tggatgagtt gggctcggca ggctccaggg 180
 agaggacagg aatggattgg agagattaat ccaggaagca gtacgataaa ctatacgcca 240
 tctctgaagg ataaattcat catctccaga gacaacgcca aaaatacgct gttcctgcaa 300
 atgagcaaag tgagatctga ggactcagcc ctttattact gtgcaagact ggggtatggg 360
 aactacggat gggctctgga ctactgggggt caaggaacct cagtcaccgt ctcctca 417

<210> 3

<211> 131

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 3

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala
 1 5 10 15
 Ser Arg Ser Asp Val Leu Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val
 20 25 30
 Ser Leu Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Ile
 35 40 45
 Val Asp Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro
 50 55 60
 Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
 65 70 75 80
 Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
 85 90 95
 Leu Lys Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Ile Tyr Tyr Cys
 100 105 110
 Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu
 115 120 125
 Glu Leu Lys
 130

<210> 4

<211> 393

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 4

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgccttc cagaagtgat 60
 gttttgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc 120
 tcttgcagat ctagtcagag cattgtagat agtaatggaa acacctatit agaatgggtac 180
 ctgcagaaac caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagttttccaa ccgattttct 240
 ggggtcccag acagggttcag tggcagtggg tcaggggacag atttcacact caagatcagc 300
 agagtggagg ctgaggatct gggaatttat tactgctttc aagggttcaca tgttccgctc 360
 acgttcggtg ctgggaccaa gttggagctg aaa 393

<210> 5

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 5

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe Trp Met Ser

1 5 10

<210> 6

<211> 30

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 6

ggattcgatt ttagtagatt ctggatgagt

<210> 7

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

30

<400> 7
 Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn Tyr Thr Pro Ser Leu Lys
 1 5 10 15
 Asp

<210> 8
 <211> 51
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 8

gagattaatc caggaagcag tacgataaac tatacgccat ctctgaagga t

51

<210> 9
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 9

Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp Tyr

1 5 10

<210> 10
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 10

ctggggtatg gtaactacgg atgggctctg gactac

36

<210> 11
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 11

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val Asp Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 12
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 12

agatctagtc agagcattgt agatagtaat ggaaacacct atttagaa

48

<210> 13
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 13

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 14
 <211> 21

<212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 14

aaagttttcca accgattttc t

21

<210> 15
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 15

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 16
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 16

tttcaagggtt cacatgtttcc gctcacg

27

<210> 17
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20

25

30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35

40

45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50

55

60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65

70

75

80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85

90

95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100

105

110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115

120

125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130

135

140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145

150

155

160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165

170

175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180

185

190

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

195

200

205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210

215

220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 18

<211> 993

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo.

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 18

gcctccacca agggcccacg ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccttggtctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacggtgtcg 120
 tggaactcag gcgcctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtctca 180
 ggactctact cctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 aaatcttgtg aaaaaactca cacatgccc cagtgtccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagttt tctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccctt 420
 gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggaactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggcttc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacacgc tgcccccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
 ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa tga 993

<210> 19

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 19

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

100 105

<210> 20
 <211> 327
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 20
 cggggaactg tggctgcacc atctgtcttc atcttcccg ccatctgatga gcagttgaaa 60
 tctggaactg cctctgttgt gtgcctgctg aataacttct atcccagaga ggccaaagta 120
 cagtgggaagg tggataacgc cctccaatcg ggtaactccc aggagagtgt cacagagcag 180
 gacagcaagg acagcaccta cagcctcagc agcaccctga cgctgagcaa agcagactac 240
 gagaaacaca aagtctacgc ctgcgaagtc acccatcagg gcctgagctc gcccgtcaca 300
 aagagcttca acaggggaga gtgttag 327

<210> 21
 <211> 330
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 21

Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	
1				5					10					15		
Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	
			20					25					30			
Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	
		35					40					45				
Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	
	50					55					60					
Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	
65					70				75					80		
Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	
			85					90						95		
Arg	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	
			100					105					110			
Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	
		115				120						125				
Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	
	130					135					140					
Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	
145					150				155					160		
Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	Val	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	
			165					170					175			
Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	
			180					185					190			
His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	
		195				200						205				
Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	
	210					215					220					
Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	
225					230				235					240		
Met	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	
			245					250					255			
Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	
		260						265					270			
Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
		275					280					285				
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	

290	295	300												
Val Phe Ser Cys Ser	Val Met His Glu Ala Leu	His Asn His Tyr Thr												
305	310	315												
Gln Lys Ser Leu Ser	Leu Ser Pro Gly Lys													
	325	330												
<210>	22													
<211>	330													
<212>	PRT													
<213>	Trình tự nhân tạo													
<220>														
<223>	Được tổng hợp													
<400>	22													
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys														
1	5	10	15											
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr														
	20	25	30											
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser														
	35	40	45											
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser														
	50	55	60											
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr														
65	70	75	80											
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys														
	85	90	95											
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys														
	100	105	110											
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro														
	115	120	125											
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys														
	130	135	140											
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp														
145	150	155	160											
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu														
	165	170	175											
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu														
	180	185	190											
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn														
	195	200	205											
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly														
	210	215	220											
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu														
225	230	235	240											
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr														
	245	250	255											
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn														
	260	265	270											
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe														
	275	280	285											
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn														
	290	295	300											
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr														
305	310	315	320											
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys														
	325	330												

<210> 23
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 23

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 20 25 30
 Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 35 40 45
 Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 50 55 60
 Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 65 70 75 80
 Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
 100 105 110
 Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
 115 120 125
 Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
 130 135 140
 Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
 145 150 155 160
 Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
 165 170 175
 Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
 180 185 190
 His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
 195 200 205
 Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
 210 215 220
 Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
 225 230 235 240
 Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
 245 250 255
 Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
 260 265 270
 Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
 275 280 285
 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
 290 295 300
 Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
 305 310 315 320
 Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 325 330

<210> 24

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 24

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 1 5 10 15
 Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 20 25 30
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 35 40 45

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

<210> 25
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 25

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

<210> 26
 <211> 147
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 26

Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
 1 5 10 15
 Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
 20 25 30
 Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
 35 40 45
 Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
 50 55 60
 Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
 65 70 75 80
 Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys
 85 90 95
 Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu
 100 105 110
 Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala
 115 120 125
 Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn
 130 135 140
 Pro Lys Glu
 145

<210> 27
 <211> 127
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 27

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

<210> 28

<211> 127

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 28

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

<210> 29

<211> 138

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 29

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

115 120 125
 Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
 130 135
 <210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 30
 Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala
 1 5
 <210> 31
 <211> 41
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 31
 Phe His Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro
 1 5 10 15
 Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr
 20 25 30
 Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
 35 40
 <210> 32
 <211> 990
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 32
 gccctccacca aggggtccatc ggtcttcccc ctggcacccct cctccaagag cacctctggg 60
 ggcacagcgg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacgggtgtcg 120
 tggaactcag gcgccttgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtectca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg caccagacc 240
 tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
 aaatcttgtg acaaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
 ccgtcagctc tctcttcccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggaccct 420
 gaggtcacat gcgtgggtgg ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
 tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
 agcacgtacc gtgtgggtcag cgtcctcacc gtctctgacc aggactggct gaatggcaag 600
 gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
 aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcctccatc ccgggaggag 720
 atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
 gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccggtg 840
 ctggactccg acggctcctt ctctctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
 cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
 cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990
 <210> 33
 <211> 321
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 33
 cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttccat ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
 ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
 tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
 agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgagcg tgagcaaagc agactacgag 240
 aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
 agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 34
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 34
 actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
 actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
 aagggtgata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
 aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
 cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccggt cacaaagagc 300
 ttcaacaggg gagagtgt 313
 <210> 35
 <211> 19
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 35
 Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1 5 10 15
 Val Gln Cys
 <210> 36
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 36
 atgaactttg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaagggtgt ccagtgt 57
 <210> 37
 <211> 20
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 37
 Met Glu Ser His Thr Gln Val Phe Val Phe Val Phe Leu Trp Leu Ser
 1 5 10 15
 Gly Val Asp Gly
 20
 <210> 38
 <211> 60
 <212> ADN
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 38
 atggagtcac atactcaggt ctttgtattc gtgtttctct gggtgtctgg tgttgacgga 60
 <210> 39
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 39

Ser Tyr Thr Met Ser

1 5

<210> 40

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 40

Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 41

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 41

His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp Val

1 5 10 15

<210> 42

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 42

Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr

1 5 10 15

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 43

Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser

1 5

<210> 44

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 44

Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr

1 5

<210> 45

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 45

Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala

1 5

<210> 46
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 46
 Asn Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 47
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 47
 Ser Ile Ser Ser Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Lys Gly
 1 5 10 15
 <210> 48
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 48
 Tyr Tyr Tyr Gly Gln Tyr Phe Asp Phe
 1 5
 <210> 49
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 49
 Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Thr Val Ala
 1 5 10
 <210> 50
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 50
 Ser Ala Ser Tyr Arg Cys Thr
 1 5
 <210> 51
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 51
 Gln Gln His Tyr Ser Thr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 52

Asn Tyr Tyr Met Ser

1 5

<210> 53

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 53

Tyr Ile Ser Ile Asp Gly Asn Asn Ile Tyr His Pro Asp Ser Val Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 54

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 54

Asp Ser Asp Tyr Gly Tyr Phe Asp Val

1 5

<210> 55

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 55

Arg Ser Ser Gln Ser Ile Val His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu

1 5 10 15

<210> 56

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 56

Lys Val Ser Lys Arg Phe Ser

1 5

<210> 57

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 57

Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu Thr

1 5

<210> 58

<211> 455

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 58

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

450 455

<210> 59
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 59

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

<210> 60
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 60

Arg Tyr Trp Ile Thr
 1 5

<210> 61
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 61

Asp Ile Tyr Pro Gly Ser Gly Arg Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys
 1 5 10 15
 Asn

<210> 62
 <211> 9

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 62
 Tyr Tyr Gly Ser Thr Tyr Phe Tyr Val
 1 5
 <210> 63
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 63
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu Tyr Lys Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15
 <210> 64
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 64
 Leu Met Ser Thr Arg Ala Ser
 1 5
 <210> 65
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 65
 Gln Gln Leu Val Glu Tyr Pro Arg Thr
 1 5
 <210> 66
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 66
 Ser Tyr Ala Met Ser
 1 5
 <210> 67
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 67
 Ser Ile Ser Gly Ser Gly Asp Thr Thr Lys Tyr Thr Asp Ser Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 68
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

```

<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 68
Asp Gly Ser Gly Arg Ile Asp Pro Phe Ala Leu
1          5          10
<210> 69
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 69
Arg Ser Ser Arg Ser Leu Val Tyr Ser Asp Gly Asn Ile Tyr Leu Asn
1          5          10          15
<210> 70
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 70
Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly
1          5
<210> 71
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 71
Met Gln Gly Thr His Trp Pro Arg Thr
1          5
<210> 72
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 72
Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly Lys Thr
1          5          10
<210> 73
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 73
Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu
1          5          10
<210> 74
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 74
Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val

```

1 100 5 10
 <210> 75
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 75
 Ser Tyr Thr Met Ser
 1 5
 <210> 76
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 76
 Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
 1 5 10 15
 Gly
 <210> 77
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 77
 His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp Val
 1 5 10 15
 <210> 78
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 78
 Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
 1 5 10 15
 <210> 79
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 79
 Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser
 1 5
 <210> 80
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 80
 Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
 1 5
 <210> 81

<211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 81

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

<210> 82
 <211> 122
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 82

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

<210> 83
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 83

Glu	Val	Gln	Leu	Val	Glu	Ser	Gly	Gly	Gly	Leu	Val	Gln	Pro	Gly	Gly
1			5					10					15		
Ser	Leu	Arg	Leu	Ser	Cys	Ala	Ala	Ser	Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr
		20					25					30			
Gly	Met	Ser	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Leu	Val
	35					40					45				

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

<210> 84
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 34

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

<210> 85
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 85

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

<210> 86
 <211> 121
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp

<400> 86

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

<210> 87

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 87

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 Asp 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 Ile Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly
 85 90 95
 Ser His Val Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
 100 105 110

<210> 88

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 88

Asp Val Val 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 Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu His 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 Phe Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110
 <210> 89
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 89
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser 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 Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His 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 Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 90
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens
 <400> 90
 Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val His Ser
 20 25 30
 Asp Gly Asn Thr Tyr Leu Asn Trp Phe Gln Gln Arg Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Asp Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln Gly
 85 90 95
 Thr His Trp Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 <210> 91
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 91
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser 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 Asp 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 His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 92
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 92

Asp Val Val Met Thr Gln Ser 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 Asp Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Arg 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 His Val Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 93
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 93

Arg Phe Trp Met Ser
 1 5

<210> 94
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 94

Gly Phe Asp Phe Ser Arg Phe
 1 5

<210> 95
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 95

Ser Arg Phe Trp Met Ser
 1 5

<210> 96
 <211> 6
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp

```

<400> 96
Asn Pro Gly Ser Ser Thr
1 5
<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 97
Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn
1 5 10
<210> 98
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 98
Trp Ile Gly Glu Ile Asn Pro Gly Ser Ser Thr Ile Asn
1 5 10
<210> 99
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 99
Ala Arg Leu Gly Tyr Gly Asn Tyr Gly Trp Ala Leu Asp
1 5 10
<210> 100
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 100
Asn Thr Tyr Leu Glu Trp Tyr
1 5
<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 101
Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe
1 5 10
<210> 102
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 102
Phe Gln Gly Ser His Val Pro Leu
1 5

```