



- (12) BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẰNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ
(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11) CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ
(51)⁸ C07K 16/18; G01N 33/68; A61K 47/68; (13) B
A61P 25/28



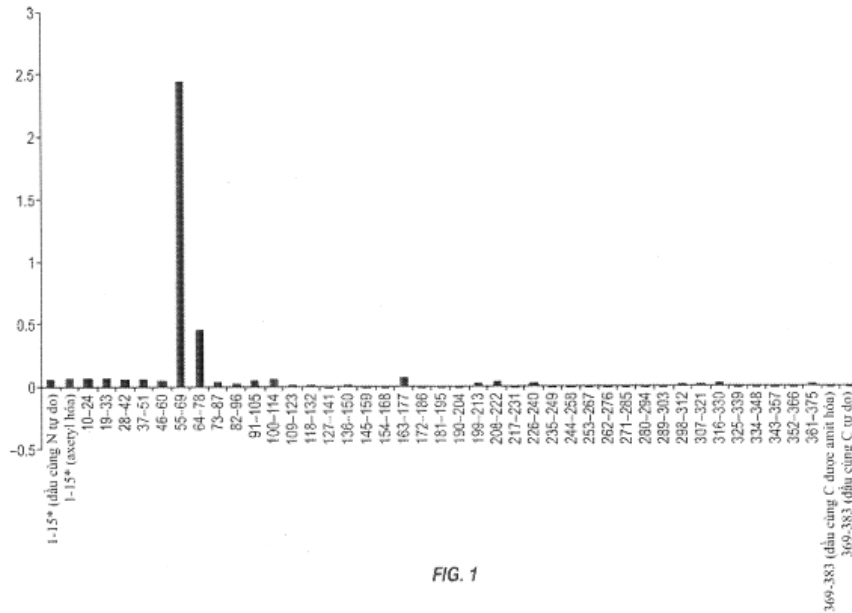
1-0048973

-
- (21) 1-2018-05389 (22) 02/05/2017
(86) PCT/IB2017/052545 02/05/2017 (87) WO 2017/191561 09/11/2017
(30) 62/330,800 02/05/2016 US
(45) 25/07/2025 448 (43) 25/04/2019 373A
(73) PROTHENA BIOSCIENCES LIMITED (IE)
Adelphi Plaza, Upper George's Street, Dun Laoghaire, Co. Dublin, A96 T927, Ireland
(72) BARBOUR, Robin (US); DOLAN, Philip James (US); LIU, Yue (US).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D &N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)
-

- (54) KHÁNG THỂ NHẬN BIẾT TAU, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2018-05389

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



Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

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

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

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

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

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể đơn dòng được phân lập liên kết đặc hiệu với tau. Ví dụ về các kháng thể liên kết với epitop nằm trong các gốc axit amin 55-78, 60-75 hoặc 61-70 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 113-136, 118-133, hoặc 119-128 của SEQ ID NO:1).

Một số kháng thể này cạnh tranh với kháng thể 16G7 để liên kết với tau người. Một số kháng thể như vậy liên kết với cùng một epitop trên tau người như 16G7.

Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 16G7, trong đó 16G7 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 11. Trong một số kháng thể, ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9, và 10) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13, và 14).

Ví dụ, kháng thể này có thể là 16G7 hoặc dạng khám, được ngụy trang, hoặc được làm tương thích với người của nó. Trong một số kháng thể này, chuỗi nặng biến đổi có sự đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể này, chuỗi nhẹ biến đổi có sự đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể này, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có sự đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người. Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành chứa ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9, và 10) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13, và 14); với điều kiện là vị trí H31 bị chiếm bởi S hoặc G, vị trí H60 bị chiếm bởi N hoặc A và vị trí 64 bị chiếm bởi K hoặc Q. Trong một số kháng thể này, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 49. Trong một số kháng thể này, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 50. Trong một số kháng thể này, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 51. Trong một số kháng thể này, kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người.

Trong một số kháng thể này, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 49 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 50. Trong một số kháng thể này, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 49 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 51.

Một số kháng thể là kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hoặc khảm liên kết đặc hiệu với tau người, trong đó 16G7 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO: 11. Một số kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng của 16G7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 16G7. Trong một số kháng thể này, các CDR có định nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, Tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact.

Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Tổ hợp Kabat/Chothia của 16G7 (SEQ ID NO: 8-10) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Tổ hợp Kabat/Chothia của 16G7 (SEQ ID NO: 12-14).

Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat của 16G7 (SEQ ID NO:39, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Kabat của 16G7 (SEQ ID NO: 12-14).

Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Chothia của 16G7 (SEQ ID NO:40, SEQ ID NO:41, và SEQ ID NO:10) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Chothia của 16G7 (SEQ ID NO: 12-14).

Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM của 16G7 (SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:42, và SEQ ID NO:10) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ AbM của 16G7 (SEQ ID NO: 12-14).

Trong một số kháng thể này, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact của 16G7 (SEQ ID NO:46-48) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact của 16G7 (SEQ ID NO:43-45).

Trong một số kháng thể này, 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:15-27 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: 28-30.

Trong một số kháng thể này, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H5 bị chiếm bởi Q, H7 bị chiếm bởi P, H9 bị chiếm bởi S, H10 bị chiếm bởi V, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H13 bị chiếm bởi R, H20 bị chiếm bởi L, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H66 bị chiếm bởi K, H67 bị chiếm bởi A, H69 bị chiếm bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H73 bị chiếm bởi I, H75 bị chiếm bởi S, H80 bị chiếm bởi V, H82a bị chiếm bởi T, H82b bị chiếm bởi S, H83 bị chiếm bởi T, và H85 bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể này, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E.

Trong một số kháng thể này, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H5 bị chiếm bởi Q, H7 bị chiếm bởi P, H9 bị chiếm bởi S, H10 bị chiếm bởi V, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H13 bị chiếm bởi R, H20 bị chiếm bởi L, H48 bị chiếm bởi I, H69 bị chiếm bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H82a bị chiếm bởi T, H82b bị chiếm bởi S, H83 bị chiếm bởi T, và H85 bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, T, S, T, và E.

Trong một số kháng thể ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H5 bị chiếm bởi Q, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H20 bị chiếm bởi L, H48 bị chiếm bởi I, H69 bị chiếm bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H82a bị chiếm bởi T, H82b bị chiếm bởi S, H83 bị chiếm bởi

T, và H85 bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể, H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, L, V, T, S, T, và E.

Trong một số kháng thể này, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H12 bị chiếm bởi V, H31 bị chiếm bởi G, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H60 bị chiếm bởi A, H69 bị chiếm bởi L, H73 bị chiếm bởi I, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H31, H40, H48, H60, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, G, R, I, A, L, I, và T.

Trong một số kháng thể này, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H12 bị chiếm bởi V, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H69 bị chiếm bởi L, H73 bị chiếm bởi I, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T.

Trong một số kháng thể này, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H12 bị chiếm bởi V, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H66 bị chiếm bởi K, H67 bị chiếm bởi A, H69 bị chiếm bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H73 bị chiếm bởi I, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, K, A, L, V, I, và T.

Trong một số kháng thể này, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H12 bị chiếm bởi V, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H69 bị chiếm bởi L, H73 bị chiếm bởi I, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T. Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H7 bị chiếm bởi P, H71 bị chiếm bởi V, và H73 bị chiếm bởi I. Trong một số kháng thể, các vị trí H7, H71, và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi P, V, và I. Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H31 bị chiếm bởi G và H60 bị chiếm bởi A. Trong một số kháng thể, các vị trí H31 và H60 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi G và A.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi Q hoặc E, H5 bị chiếm bởi V hoặc Q, H7 bị chiếm bởi S hoặc P, H9 bị chiếm bởi A hoặc S, H10 bị chiếm bởi E hoặc V, H11 bị chiếm bởi V hoặc L, H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H13 bị chiếm bởi K hoặc R, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H31 bị chiếm bởi G hoặc S, H37 bị chiếm bởi V hoặc A, H38 bị chiếm bởi R hoặc K, H40 bị chiếm bởi A hoặc R, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H60 bị chiếm bởi A hoặc N, H64 bị chiếm bởi Q hoặc K, H66 bị chiếm bởi R hoặc K, H67 bị chiếm bởi V hoặc A, H69 bị chiếm bởi M hoặc L, H71 bị chiếm bởi R hoặc V, H73 bị chiếm bởi T hoặc I, H75 bị chiếm bởi I, S, hoặc A, H80 bị chiếm bởi M hoặc V, H82a bị chiếm bởi S hoặc T, H82b bị chiếm bởi R hoặc S, H83 bị chiếm bởi R hoặc T, và H85 bị chiếm bởi D hoặc E. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H37, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, A, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, L, V, A, T, S, T, và E. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, K, A, L, V, I, và T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H31, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, G, R, I, A, K, A, L, V, I, và T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H31, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, V, G, R, I, A, K, A, L, V, I, và T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H7 và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, P, V và I. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H12, H31, H40, H48, H60, H64, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, G, R, I, A, Q, L, I, và T. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, A, T, S, T, và E. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H5, H11, H12, H20, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, K, A, L, V, I, S, T, S, T, và E. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73I, H75, H80,

H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E. Trong một số kháng thể, các vị trí H7, H71, và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi P, V, và I. Trong một số kháng thể, các vị trí H71 trong vùng VH bị chiếm bởi V. Trong một số kháng thể, các vị trí H1, H7, H71, và H73 trong vùng VH bị chiếm bởi E, P, V, và I.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L4 bị chiếm bởi L, L9 bị chiếm bởi S, L15 bị chiếm bởi V, L22 bị chiếm bởi S, và L43 bị chiếm bởi S. Trong một số kháng thể, các vị trí L4, L9, L15, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, S, và S.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L4 bị chiếm bởi L, L9 bị chiếm bởi S, L15 bị chiếm bởi V, L18 bị chiếm bởi K, L19 bị chiếm bởi V, L21 bị chiếm bởi M, L22 bị chiếm bởi S, và L43 bị chiếm bởi S. Trong một số kháng thể, L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, K, V, M, S, và S.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L4 bị chiếm bởi M hoặc L, L9 bị chiếm bởi D hoặc S, L15 bị chiếm bởi L hoặc V, L18 bị chiếm bởi R hoặc K, L19 bị chiếm bởi A hoặc V, L21 bị chiếm bởi I hoặc M, L22 bị chiếm bởi N hoặc S, L43 bị chiếm bởi P hoặc S, và L48 bị chiếm bởi I hoặc M. Trong một số kháng thể, L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, K, V, M, S, và S.

Trong một số kháng thể, các vị trí L4, L9, L15, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, S, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, K, V, M, S, và S.

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: 15-27 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 SEQ ID NO: 28-30. 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: 15-27 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 SEQ ID NO: 28-30.

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:15-27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số SEQ ID NO:28-30. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:28. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:29. Trong một số kháng thể, vùng

trở thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trở thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trở thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trở thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:30.

Ví dụ, kháng thể này có thể là kháng thể khảm. Ví dụ, kháng thể này có thể là kháng thể được ngưng tụ.

Kháng thể này có thể là kháng thể chuột không hoạt động, khảm, được ngưng tụ hoặc được làm tương thích với người hoặc đoạn liên kết, đoạn Fab kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab'2, hoặc Fv chuỗi đơn. Một số kháng thể này có isotyp IgG1 người, trong khi các kháng thể khác có thể có isotyp IgG2 hoặc IgG4 người. Một số kháng thể có vùng biến đổi chuỗi nhẹ trở thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng trở thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng của một số kháng thể là dạng đột biến của vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người mà có khả năng liên kết với thụ thể Fc γ bị giảm so với vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người.

Một số kháng thể có thể có ít nhất một đột biến trong vùng hằng định, như đột biến làm giảm sự cố định hoặc sự hoạt hóa bổ thể bởi vùng hằng định này, ví dụ, đột biến ở một hoặc nhiều trong số các vị trí 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 và 331 theo cách đánh số EU. Một số kháng thể có alanin ở các vị trí 318, 320 và 322. Một số kháng thể có thể tinh khiết ít nhất là 95% khối lượng/khối lượng. Kháng thể này có thể được liên hợp với dược chất, chất gây độc tế bào, chất kìm hãm tế bào, chất dinh dưỡng thần kinh, hoặc chất bảo vệ thần kinh.

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

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

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất phương pháp làm tương thích với người kháng thể không phải của người bất kỳ được mô tả ở đây, ví dụ, kháng thể chuột

16G7, trong đó 16G7 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của SEQ ID NO:7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của SEQ ID NO:11. Các phương pháp này có thể bao gồm chọn một hoặc nhiều kháng thể nhận, tổng hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nặng của chuột và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nhẹ kháng thể chuột, và biểu hiện các axit nucleic này trong tế bào chủ để sản sinh ra kháng thể được làm tương thích với người.

Các phương pháp sản sinh kháng thể, như kháng thể được làm tương thích với người, khảm hoặc được nguy trang, ví dụ các dạng được làm tương thích với người, khảm hoặc được nguy trang của 16G7, cũng được đề xuất. Trong các phương pháp này, các tế bào được biến nạp bằng các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể này được nuôi cấy để các tế bào này tiết ra kháng thể. Sau đó kháng thể này có thể được tinh chế từ môi trường nuôi cấy tế bào.

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

Một số tế bào có thể được nhân giống trong các điều kiện chọn lọc và được sàng lọc cho các dòng tế bào biểu hiện và tiết tự nhiên ít nhất là 100 mg/L/10⁶ tế bào/24 giờ. Từng tế bào có thể được phân lập từ các tế bào đã chọn lọc. Sau đó các tế bào đã tách dòng từ một tế bào đơn lẻ có thể được lập ngân hàng. Từng tế bào có thể được chọn lọc dựa vào các đặc điểm mong muốn, như hiệu suất của kháng thể này. Các dòng tế bào điển hình là các dòng tế bào biểu hiện 16G7.

Sáng chế cũng mô tả phương pháp ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ tau ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do tau, bao gồm sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể được mô tả ở đây, nhờ đó ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ tau ở đối tượng này. Các kháng thể điển hình bao gồm các dạng được làm tương thích với người của 16G7.

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

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

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

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

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

Sáng chế cũng mô tả phương pháp phát hiện các lắng đọng protein tau ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh bị gây ra bởi sự kết tụ hoặc lắng đọng tau bao gồm bước sử dụng cho đối tượng kháng thể được mô tả ở đây, và phát hiện kháng thể đã được liên kết với Tau ở đối tượng này. Các ví dụ về bệnh này là bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ura bạc, bệnh do tau thần

kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP). Trong một số phương án, kháng thể này được sử dụng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch vào cơ thể của đối tượng. Trong một số phương án, kháng thể này được sử dụng trực tiếp cho não của đối tượng bằng cách tiêm trong hộp sọ hoặc bằng cách khoan một lỗ qua hộp sọ của đối tượng. Trong một số phương án, kháng thể này được đánh dấu. Trong một số phương án, kháng thể này được đánh dấu bằng nhãn huỳnh quang, nhãn thuận từ, hoặc nhãn hoạt động phóng xạ. Trong một số phương án, nhãn hoạt động phóng xạ được phát hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật chụp positron cắt lớp (PET) hoặc kỹ thuật chụp cắt lớp vi tính phát xạ photon đơn (SPECT).

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

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

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 mô tả các kết quả của các thử nghiệm được thiết kế để lập bản đồ (các) epitop được liên kết bởi kháng thể đơn dòng 16G7 của chuột.

Fig.2 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 16G7. Các CDR như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia được in đậm. Các vị trí trong các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 16G7 trong đó các gốc axit amin khác với trình tự "Chính" được đóng khung.

Fig.3 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 16G7. Các CDR như được xác định bởi Kabat được in đậm. Các vị trí trong các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 16G7 trong đó các gốc axit amin khác với trình tự "Chính" được đóng khung.

Fig.4A và 4B mô tả các kết quả của các thử nghiệm thể hiện là 16G7 bắt giữ miễn dịch tau từ mô bệnh Alzheimer của người.

Fig.5 mô tả kết quả của các thử nghiệm phá vỡ sự kết tụ cho các kháng thể kháng tau đơn dòng của chuột đã chọn lọc.

Fig.6 mô tả ái lực của kháng thể 16G7 chuột với tau.

Fig.7 mô tả động học liên kết cho kháng thể 16G7 khảm và các kháng thể 16G7 được làm tương thích với người VHV2a, VHV2b, và VHV6a H7L2 đối với tau.

Fig.8 mô tả ái lực của đoạn 16G7 Fab của chuột và kháng thể 16G7 không hoạt động của chuột đối với tau kết tụ.

Mô tả vắn tắt trình tự

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

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

SEQ ID NO:3 thể hiện trình tự axit amin của một đồng dạng của tau người (Swiss-

Prot P10636-6), (tau người 4R0N).

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

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

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

SEQ ID NO: 7 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 8 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO:9 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 10 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 11 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 12 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 13 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 14 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO:15 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv1.

SEQ ID NO:16 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv2.

SEQ ID NO:17 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng

thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv2a.

SEQ ID NO:18 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv2aB7.

SEQ ID NO:19 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv2b.

SEQ ID NO:20 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv2bH7.

SEQ ID NO:21 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv3.

SEQ ID NO:22 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv4.

SEQ ID NO:23 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv5V.

SEQ ID NO:24 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv5VR.

SEQ ID NO:25 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv6a.

SEQ ID NO:26 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv6b.

SEQ ID NO:27 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv7.

SEQ ID NO:28 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VLv1.

SEQ ID NO:29 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VLv2.

SEQ ID NO:30 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VLv3.

SEQ ID NO:31 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nặng

Acc.# AAA18265.1.

SEQ ID NO:32 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nặng

Acc.# ADW08092.1.

SEQ ID NO:33 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nặng

Acc.# IMGT# IGHV1-2*02.

SEQ ID NO:34 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ

Acc.# AAB24404.1.

SEQ ID NO:35 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ

Acc.# AEK69364.1.

SEQ ID NO:36 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ

Acc.# IMGT#IGKV4-1*01.

SEQ ID NO: 37 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 38 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 39 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 40 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Chothia của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 41 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Chothia của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 42 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 AbM của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 43 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Contact của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 44 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Contact của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 45 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Contact của kháng thể

16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 46 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Contact của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 47 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Contact của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 48 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Contact của kháng thể 16G7 của chuột.

SEQ ID NO: 49 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia khác của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người.

SEQ ID NO: 50 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat khác của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người.

SEQ ID NO: 51 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat khác của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người.

SEQ ID NO:52 thể hiện trình tự axit amin liên ứng trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng của các kháng thể 16G7 của chuột và 16G7 được làm tương thích với người (được đánh dấu là "Chính" trong Fig.2).

SEQ ID NO:53 thể hiện trình tự axit amin liên ứng giữa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 của chuột và kháng thể 16G7 được làm tương thích với người (được đánh dấu là "Chính" trong Fig.3).

SEQ ID NO: 54 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể 16G7 khâm.

SEQ ID NO: 55 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 khâm.

Mô tả chi tiết sáng chế

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 gây nhiễu và các tạp

chất khác sinh ra từ quá trình sản xuất hoặc tinh chế nó nhưng không loại trừ khả năng là kháng thể đơn dòng này được kết hợp với lượng dư (các) chất mang được dùng hoặc tá dược lỏng khác được dự định tạo thuận lợi cho việc sử dụng nó. Đôi khi, các kháng thể đơn dòng tinh khiết ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc 99% khối lượng/khối lượng đối với protein gây 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 và/hoặc lực hút ít nhất là 10^6 , 10^7 , 10^8 , 10^9 , 10^{10} , 10^{11} , hoặc 10^{12} M^{-1} . Liên kết đặc hiệu là liên kết có cường độ mạnh hơn 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 đặc thù trong không gian (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., xuất bản lần thứ hai Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích).

Vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc nặng globulin miễn dịch (còn được gọi ở đây lần lượt là “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 amino đến đầu carboxyl, cả vùng chức năng VL và VH đều chứa vùng khung (FR) và CDR sau đây: FR1, CDR1, FR2, CDR2, FR3, CDR3, và FR4. Các CDR 1, 2, và 3 của 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 phù hợp với định nghĩa thông thường bất kỳ về các CDR. Các định nghĩa thông thường bao gồm, định nghĩa Kabat (Kabat, *Sequences of Proteins of Immunological Interest* (National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1987 và 1991), định nghĩa Chothia (Chothia & Lesk, *J. Biol.* 196:901-917, 1987; Chothia *et al.*, *Nature* 342:878-883, 1989); tổ hợp của CDR Chothia Kabat trong đó CDR-H1 là tổ hợp của các CDR Chothia và Kabat; định nghĩa AbM được sử dụng bởi phần mềm tạo mô hình kháng thể của Oxford Molecular; và, định nghĩa contact của Martin et al (bioinfo.org.uk/abs) (xem Bảng 1). Kabat cung cấp quy ước đánh số được sử dụng rộng rãi (cách đánh số Kabat) trong đó các gốc tương ứng giữa các chuỗi nặng khác nhau hoặc giữa các chuỗi nhẹ khác nhau được đánh cùng một số. Khi kháng thể được cho là chứa các CDR theo một định nghĩa nhất định về CDR (ví dụ, Kabat), thì định nghĩa này xác định số lượng các gốc CDR tối thiểu có mặt trong kháng thể này (nghĩa là, các CDR Kabat). Không loại trừ là các gốc khác thuộc định nghĩa CDR thông thường khác nhưng nằm ngoài định nghĩa đã chỉ ra này cũng có mặt. Ví dụ, kháng thể chứa các CDR được xác định bởi Kabat bao gồm, trong số các khả năng có thể khác, kháng thể trong đó các CDR này chứa các gốc CDR Kabat và không chứa các gốc CDR khác, và kháng thể trong đó CDR H1 là CDR H1 tổ hợp Chothia-Kabat và các CDR khác chứa các gốc CDR Kabat và không chứa các gốc CDR bổ sung theo các định nghĩa khác.

Bảng 1:

Định nghĩa 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). Đó là vì sơ đồ đánh số Kabat đặt các đột biến gắn xen của gốc thêm vào ở 35A và 35B, trong khi đó cách đánh số Chothia đặt chúng ở 31A và 31B. Nếu cả H35A và H35B (đánh số Kabat) không có mặt, vòng Chothia CDR-H1 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 mà chúng thu được từ đó để liên kết đặc hiệu với đích bao gồm các chuỗi nặng riêng biệt, các chuỗi nhẹ riêng biệt Fab, Fab', F(ab')₂, F(ab)₂c, Dabs, thể nano, và Fv. Các đoạn có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách tách bằng enzym hoặc hóa học các globulin miễn dịch không hoạt động. Thuật ngữ “kháng thể” cũng bao gồm kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể được làm tương thích với người. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể hai chức năng là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác

nhau và hai vị trí liên kết khác nhau (xem, ví dụ, Songsivilai và Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.*, 79:315-321 (1990); Kostelny *et al.*, *J. Immunol.*, 148:1547-53 (1992)). Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau này bao gồm cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ 16G7 được làm tương thích với người và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ đặc hiệu với một epitop khác trên tau mà không phải epitop được liên kết bởi 16G7.

Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, một cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ là kháng thể 16G7 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, như thụ thể insulin, thụ thể yếu tố tăng trưởng tương tự insulin (IGF), thụ thể leptin, hoặc thụ thể lipoprotein, hoặc thụ thể transferrin (Friden *et al.*, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88:4771-4775, 1991; Friden *et al.*, *Science* 259:373-377, 1993). Kháng thể đặc hiệu kép này có thể được vận chuyển qua hàng rào máu não bằng cơ chế xuyên bào qua trung gian thụ thể. Sự hấp thu kháng thể đặc hiệu kép ở não có thể được tăng cường thêm bằng cách thao tác di truyền kháng thể đặc hiệu kép để làm giảm ái lực của nó với thụ thể hàng rào máu não. Ái lực với thụ thể này được làm giảm dẫn đến sự phân bố kháng thể này trong não rộng hơn (xem, ví dụ, Atwal. *et al.*, *Sci. Trans. Med.* 3, 84ra43, 2011; Yu *et al.*, *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 chức năng biến đổi nối tiếp nhau qua liên kết peptit ngắn (Wu *et al.*, *Generation và Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-IgTM) Molecule*, In: *Antibody Engineering*, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, 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 chức năng dime hóa và neo” ở Protein Kinaza 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 tảng hữu ích để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm BiTE (Micromet), DART

(MacroGenics), Fcab và Mab2 (F-star), IgG1 được thao tác di truyền Fc (Xencor) hoặc DuoBody (dựa trên sự trao đổi nhánh Fab, Genmab).

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

Các kháng thể nhận biết cùng epitop hoặc các epitop chồng lặp 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 lặp 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 một kháng thể đang được thử nghiệm ức chế sự liên kết đặc hiệu của kháng thể tham chiếu với kháng nguyên chung (*xem, ví dụ, Junghans et al., Cancer Res. 50:1495, 1990*). Kháng thể thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể tham chiếu nếu lượng dư kháng thể thử nghiệm (*ví dụ, ít nhất 2x, 5x, 10x, 20x hoặc 100x*) ức chế sự liên kết của kháng thể tham chiếu ít nhất là 50% như được đo trong thử nghiệm liên kết cạnh tranh. Một số kháng thể thử nghiệm ức chế sự 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 này liên kết với epitop liền kề với epitop được liên kết bởi kháng thể tham chiếu đủ gần để xảy ra sự cản trở không gian.

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

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

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

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

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

mẫu đối chứng thuộc cùng một loại với mô trong mẫu sinh học. Tốt hơn là, các tế bào bị tác động bởi bệnh liên quan đến tau được cho là nằm trong mẫu sinh học phát sinh từ cùng một loại tế bào (ví dụ, neuron hoặc tế bào thần kinh đệm) với loại tế bào trong mẫu đối chứng.

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

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

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

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

Tỷ lệ phần trăm đồng nhất 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) đang được so sánh với cùng một vùng của kháng thể tham chiếu, thì tỉ lệ phần trăm đồng nhất 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 ngữ cảnh chỉ ra rõ ràng, thuật ngữ “khoảng” bao gồm các thay đổi không đáng kể, như các giá trị nằm trong biên sai số chuẩn của phép đo (ví dụ, SEM) của giá trị đã cho.

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

Dạng số ít của đối tượng “một” 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.

Tổng quan

Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết với tau. Một số kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop trong các gốc 55-78 của SEQ ID NO:3 (tương ứng với các gốc 113-136 của SEQ ID NO:1), như, ví dụ, epitop trong các gốc 60-75 (tương ứng với các gốc 118-133 của SEQ ID NO:1) hoặc trong các gốc 61-70 (tương ứng với các gốc 119-128 của SEQ ID NO:1). Một số kháng thể này có thể liên kết đặc hiệu với hai peptit, ví dụ, peptit thứ nhất chứa các gốc 55-69 của SEQ ID NO:3 (tương ứng với các gốc 113-127 của SEQ ID NO:1) cũng như peptit thứ hai chứa các gốc 64-78 (tương ứng với các gốc 122-136 của SEQ ID NO:1). Một số kháng thể liên kết với tau bất kể trạng thái phosphoryl hóa. Một số kháng thể theo sáng chế có tác dụng ức chế hoặc làm chậm bệnh gây ra bởi tau và làm giảm triệu chứng kèm theo. Mặc dù không cần thiết phải hiểu cơ chế để thực hành sáng chế, sự giảm độc tính có thể xảy ra do kháng thể này cảm ứng hiện tượng thực bào tau, ức chế tau kết tụ trong phân tử hoặc giữa các phân tử, hoặc ức chế sự liên kết với các phân tử khác, bằng cách làm ổn định cấu hình không gây độc, bằng cách ức chế sự truyền các dạng tau gây bệnh trong tế bào hoặc giữa các tế bào, bằng cách phong bế sự phosphoryl hóa tau, bằng cách ngăn cản sự liên kết của tau với các tế bào, hoặc bằng

cách cảm ứng cắt phân giải protein tau, trong số các cơ chế khác. Các kháng thể theo sáng chế hoặc các chất cảm ứng các kháng thể này có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác bị gây ra bởi tau.

Các phân tử đích

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

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

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

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
70 80 90 100 110 120

SETSDAKSTP TAEAE EAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT
 130 140 150 160 170 180
 KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPA KTPPAP KTPSSGEP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
 190 200 210 220 230 240
 SRTPSLPTPP TREP KKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKS IGSTENLKHQ
 250 260 270 280 290 300
 PGGGKVQIIN KKL DLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPV DLSKVT SKCGSLGNIH
 310 320 330 340 350 360
 HKPGGGQVEV KSEK LDFKDR VQSKIGSLDN ITHV PGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
 370 380 390 400 410
 AEIVYKSPVV S GDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

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

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAE EAGI GDTPSLEDEA
 70 80 90 100 110 120
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPA KTPPA
 130 140 150 160 170 180
 PKTPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREP KKVAV VRTPPKSPSS
 190 200 210 220 230 240
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKL DLSNVQ SKCGSKDNIK
 250 260 270 280 290 300
 HVPGGGSVQI VYKPV DLSKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEK LDFKD RVQSKIGSLD
 310 320 330 340 350 360
 NITHV PGGGN KKIETHKLTFR ENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL SNVSSTGSID
 370 380
 MVDSPLATL ADEVSASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 70 80 90 100 110 120
 SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG
 130 140 150 160 170 180
 HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPA KTPPAPK
 190 200 210 220 230 240
 TPPSSGEPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSR SRTPSLPTPT REP KKVAVVR TPPKSPSSAK
 250 260 270 280 290 300
 SRLQTAPVPM PDLKNVKS KI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGSLGNIHKK

310 320 330 340 350 360
 PGGGQVEVKS EKLDLDFKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFRN AKAKTDHGAE
 370 380 390 400 410
 IVYKSPVVS GDTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
 70 80 90 100 110 120
 SETSDAKSTP TAEAEAEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT
 130 140 150 160 170 180
 KIATPRGAAP PGQKQANAT RIPAQTTPAP KTPSSGEP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR
 190 200 210 220 230 240
 SRTPSLPTP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKS IGSTENLKHQ
 250 260 270 280 290 300
 PGGGKVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDLDFKDRV QSKIGSLDNI
 310 320 330 340 350 360
 THVPGGGNKK IETHKLTFR NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
 370 380
 DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10 20 30 40 50 60
 MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEAEAGI GDTPSLEDEA
 70 80 90 100 110 120
 AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKQANA TRIPAQTTPA
 130 140 150 160 170 180
 PKTPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS
 190 200 210 220 230 240
 AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH
 250 260 270 280 290 300
 HKPGGGQVEV KSEKLDLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG
 310 320 330 340 350

AEIVYKSPVV SGGTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

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

Tau có thể được phosphoryl hóa ở một hoặc nhiều gốc axit amin bao gồm tyrosin ở các vị trí axit amin 18, 29, 97, 310, và 394 serin ở các vị trí axit amin 184, 185, 198, 199, 202, 208, 214, 235, 237, 238, 262, 293, 324, 356, 396, 400, 404, 409, 412, 413, và 422; và threonin ở các các vị trí axit amin 175, 181, 205, 212, 217, 231, và 403. Trừ khi ngữ cảnh chỉ ra một cách rõ ràng, việc đề cập đến tau, hoặc các đoạn của chúng bao gồm các trình tự axit amin người tự nhiên bao gồm các đồng dạng, đột biến và các biến thể alen của chúng.

Kháng thể

Tính đặc hiệu liên kết và các đặc điểm chức năng

Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết với tau. Một số kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop trong các gốc 55-78 của SEQ ID NO:3 (tương ứng với các gốc của 113-136 của SEQ ID NO:1), như, ví dụ, epitop trong các gốc 60-75 của SEQ ID NO:3 (tương ứng

với các gốc 118-133 của SEQ ID NO:1) hoặc trong các gốc 61-70 của SEQ ID NO:3 (trương ứng với các gốc 119-128 của SEQ ID NO:1). Một số kháng thể liên kết với tau bất kể trạng thái phosphoryl hóa. Các kháng thể này có thể thu được bằng cách gây miễn dịch bằng polypeptit tau được tinh chế từ nguồn tự nhiên hoặc được biểu hiện tái tổ hợp. Các kháng thể có thể được sàng lọc để liên kết với tau ở dạng không được phosphoryl hóa cũng như dạng trong đó một hoặc nhiều gốc dễ bị phosphoryl hóa được phosphoryl hóa. Tốt hơn nếu các kháng thể này liên kết với tau được phosphoryl hóa với các ái lực tương đương hoặc ít nhất trong khoảng hệ số là 1,5, 2 hoặc 3 lần so với tau không được phosphoryl hóa (*nghĩa là*, là “đặc hiệu phổ rộng”). 16G7 là ví dụ về kháng thể đơn dòng đặc hiệu phổ rộng. Sáng chế còn đề xuất các kháng thể liên kết với cùng một epitop với bất kỳ trong số các kháng thể trên đây, như, ví dụ, epitop của 16G7. Cũng được bao gồm là các kháng thể cạnh tranh để liên kết với tau với bất kỳ trong số các kháng thể trên đây, như, ví dụ, cạnh tranh với 16G7.

Các kháng thể được đề cập trên đây có thể được tạo ra từ đầu bằng cách gây miễn dịch bằng peptit bao gồm các gốc 55-78, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO: 3 (lần lượt tương ứng với các gốc 113-136, 113-127, hoặc 122-136 của SEQ ID NO:1) hoặc bằng cách gây miễn dịch bằng polypeptit tau có độ dài đầy đủ hoặc một đoạn của nó chứa các gốc này và sàng lọc về khả năng liên kết đặc hiệu với peptit chứa các gốc này. Các peptit này tốt hơn nếu được liên kết vào phân tử liên hợp khác loài giúp gây ra đáp ứng kháng thể với peptit này. Liên kết này có thể là trực tiếp hoặc qua peptit đệm hoặc axit amin đệm. Xystein được sử dụng làm axit amin đệm vì nhóm SH tự do của nó tạo thuận lợi cho sự liên kết của phân tử mang. Cầu nối polyglyxin (*ví dụ*, 2-6 glyxin), có hoặc không có gốc xystein giữa các glyxin và peptit này cũng có thể được sử dụng. Phân tử mang có tác dụng cung cấp epitop tế bào T giúp gây ra đáp ứng kháng thể kháng lại peptit này. Một số phân tử mang thường được sử dụng cụ thể là hemoxyanin của loài ốc keyhole limpet (KLH), albumin trứng và albumin huyết thanh bò (BSA). Các đoạn đệm peptit có thể được bổ sung vào kháng nguyên peptit như một phần của quy trình tổng hợp peptit pha rắn. Các phân tử mang thường được bổ sung vào bằng cách liên kết chéo hóa học. Một số ví dụ về các chất liên kết chéo hóa học mà có thể được sử dụng bao gồm N-maleimido-6-aminocaproyl este chéo hoặc m-maleimidobenzoyl-N-hydroxysuccinimit este (MBS) (xem ví dụ, Harlow, E. et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y. 1988; Sinigaglia et al., *Nature*,

336:778-780 (1988); Chicz et al., J. Exp. Med., 178:27-47 (1993); Hammer et al., Cell 74:197-203 (1993); Falk K. et al., Immunogenetics, 39:230-242 (1994); WO 98/23635; và, Southwood et al. J. Immunology, 160:3363-3373 (1998)). Phân tử mang và đoạn đệm nếu có có thể được liên kết với một trong hai đầu của kháng nguyên này.

Peptit có đoạn đệm và phân tử mang tùy ý có thể được sử dụng để gây miễn dịch cho các động vật thí nghiệm hoặc tế bào B như được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Dịch nổi chứa tế bào lai có thể được kiểm tra về khả năng liên kết với một hoặc nhiều peptit bao gồm các gốc 55-78, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO: 3 (lần lượt tương ứng với các gốc 113-136, 113-127, hoặc 122-136, của SEQ ID NO:1) và/hoặc các dạng được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa của tau, như, ví dụ, đồng dạng có độ dài đầy đủ của tau với vị trí 404 ở dạng được phosphoryl hóa. Peptit này có thể được liên kết với phân tử mang hoặc nhãn khác để tạo thuận lợi cho thử nghiệm sàng lọc. Trong trường hợp này, phân tử mang hoặc nhãn tốt hơn là khác với tổ hợp của đoạn đệm và phân tử mang được sử dụng để gây miễn dịch để loại bỏ các kháng thể đặc hiệu với đoạn đệm hoặc phân tử mang mà không phải là peptit tau. Bất kỳ trong số các đồng dạng của tau có thể được sử dụng.

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết với các epitop nằm trong tau. Kháng thể được ký hiệu 16G7 là một kháng thể chuột điển hình như vậy. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 16G7 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng của chuột, khảm, được ngụy trang và dạng được làm tương thích với người của kháng thể này. Kháng thể này đã được lưu trữ là [SỐ LƯU TRỮ]. Kháng thể này liên kết đặc hiệu bên trong các gốc axit amin 55-78, 55-69 hoặc 64-78 của (SEQ ID NO: 3 (lần lượt tương ứng với các gốc 113-136, 113-127, hoặc 122-136, của SEQ ID NO:1)). Kháng thể này còn được đặc trưng bởi khả năng liên kết với cả tau được phosphoryl hóa và tau không được phosphoryl hóa, cả dạng không gây bệnh và dạng gây bệnh và các cấu hình của tau, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau.

Một số kháng thể theo sáng chế liên kết với cùng một epitop hoặc epitop gộp lên nhau với kháng thể được ký hiệu là 16G7. Các trình tự của vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể này được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO:11. Các kháng thể khác có tính đặc hiệu liên kết như vậy có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột bằng tau hoặc một phần của nó chứa epitop mong muốn và

sàng lọc các kháng thể thu được về khả năng liên kết với tau tùy ý cạnh tranh với kháng thể có các vùng biến đổi của 16G7 chuột (IgG1 kappa). Các đoạn của tau 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 dược giúp gây ra đáp ứng này. Các kháng thể này có thể được sàng lọc về khả năng liên kết phân biệt với tau hoặc một đoạn của nó so với các đột biến chứa 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 kỹ thuật gây đột biến các gốc cụ thể và các kháng thể này có thể có chung các đặc điểm chức năng với các kháng thể điển hình khác. Các đột biến này có thể là đột biến thế thay thế hệ thống bằng alanin (hoặc serin nếu alanin đã có sẵn) một gốc một lần, hoặc các khoảng giãn cách 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, 16G7) 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 nhau. Vùng biến đổi chuỗi nặng này có thể, ví dụ, thu được từ thư viện của các vùng biến đổi chuỗi nặng của người được sắp xếp lại. Thể thực khuẩn thể hiện khả năng liên kết đặc hiệu mạnh đối với tau hoặc một đoạn của nó (ví dụ, ít nhất là 10^8 và tốt hơn là, ít nhất là $10^9 M^{-1}$) được chọn. Sau đó vùng biến đổi chuỗi nặng từ 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 đối với tau được chọn. Các kháng thể tạo thành thường có tính đặc hiệu epitop giống hoặc tương tự với nguyên liệu khởi đầu của chuột.

CDR tổ hợp Kabat/Chothia của chuỗi nặng của 16G7 được ký hiệu lần lượt là các SEQ ID NO: 8, 9, và 10, và các CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 16G7 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 12, 13, và 14.

Bảng 2: Các CDR 16G7 như được xác định bởi Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat, AbM, và Contact

Vòng	Kabat	Chothia	Tổ hợp Chothia & Kabat	AbM	Contact
L1	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L24--L34 SEQ ID NO:12	L30--L36 SEQ ID NO: 43
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: 44
L3	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L97 SEQ ID NO:14v	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L96 SEQ ID NO:45
H1	H31--H35B SEQ ID NO:39	H26--H32 SEQ ID NO:40	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:46
H2	H50--H65 SEQ ID NO: 9	H52--H56 SEQ ID NO:41	H50--H65 SEQ ID NO: 9	H50--H58 SEQ ID NO:42	H47--H58 SEQ ID NO:47
H3	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H95--H102 SEQ ID NO:10	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H95--H102 SEQ ID NO: 10	H93--H101 SEQ ID NO:48

Các kháng thể khác có thể thu được bằng kỹ thuật gây đột biến cADN mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể điển hình, như 16G7. Các kháng thể đơn dòng mà tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 16G7 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 bất kỳ, nhưng tốt hơn nếu là Kabat, mà đồng nhất 90%, 95%, 99% hoặc 100% với các CDR tương ứng của 16G7 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) các CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ 16G7. 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 16G7 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 16G7. Các kháng thể này có thể bao gồm cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. CDR chủ yếu là từ CDR 16G7 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 16G7 về trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ trưởng thành và duy trì được các đặc điểm chức năng của chúng, và/hoặc khác biệt với 16G7 ở một số lượng nhỏ các đột biến thể (*ví dụ*, đột biến thể bảo tồn), đột biến mất đoạn, hoặc đột biến gắn xen axit amin không quan trọng về chức năng.

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

Các kháng thể không phải của người

Quy trình sản xuất các kháng thể không phải của người khác, *ví dụ*, chuột, chuột hoang, linh trưởng, thỏ hoặc chuột cống, kháng tau hoặc một đoạn của nó (*ví dụ*, các gốc axit amin 55-78, 60-75, 61-70, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO: 3, lần lượt tương ứng

với các gốc axit amin 113-136, 118-133, 119-128, 113-127, hoặc 122-136 của SEQ ID NO:1) có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, gây miễn dịch động vật này bằng tau hoặc một đoạn của nó. Xem Harlow & Lane, *Antibodies, A Laboratory Manual* (CSHP NY, 1988) (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích). Kháng nguyên này có thể thu được từ nguồn tự nhiên, bằng cách tổng hợp peptit, hoặc biểu hiện tái tổ hợp. Tùy ý, kháng nguyên này có thể được sử dụng bằng cách được dung hợp hoặc tạo phức với protein mang. Tùy ý, kháng nguyên này có thể được sử dụng với tá dục. Một số loại tá dục có thể được sử dụng như được mô tả dưới đây. Tá dục Freund hoàn chỉnh sau đó là tá dục không hoàn chỉnh được ưu tiên hơn để gây miễn dịch các động vật thí nghiệm. Thỏ hoặc chuột hàng 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 tau hoặc epitop trong tau (ví dụ, epitop chứa một hoặc nhiều trong số các gốc axit amin 55-78, 60-75 hoặc 61-70 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 113-136, 118-133 hoặc 119-128 của SEQ ID NO:1). Bước 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 tau, như các biến thể tau chứa các gốc axit amin 55-78, 60-75, 61-70, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 113-136, 118-133, 119-128, 113-127, hoặc 122-136 của SEQ ID NO:1) hoặc các đột biến trong các gốc này, và xác định biến thể tau nào liên kết với kháng thể này. Khả năng liên kết có thể được đánh giá, ví dụ, bằng kỹ thuật thấm tách Tây, FACS hoặc ELISA.

Các kháng thể được làm tương thích với người

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

yếu là từ các trình tự kháng thể người. Tương tự, chuỗi nặng được làm tương thích với người có ít nhất là một, hai và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ chuỗi nặng của kháng thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nặng, nếu có mặt, chủ yếu là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng của người và trình tự vùng hằng định của người. Tương tự, chuỗi nhẹ được làm tương thích với người có ít nhất là một, hai và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ chuỗi nhẹ kháng thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nhẹ, nếu có mặt, chủ yếu là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ của người và trình tự vùng hằng định của người. Ngoài các thể nano và dAb, kháng thể được làm tương thích với người chứa chuỗi nặng được làm tương thích với người và chuỗi nhẹ được làm tương thích với người. CDR trong kháng thể được làm tương thích với người chủ yếu là từ CDR tương ứng trong kháng thể không phải của người khi ít nhất là 85%, 90%, 95% hoặc 100% các gốc tương ứng (như được xác định bởi định nghĩa thông thường bất kỳ nhưng tốt hơn nếu được xác định bằng Kabat) là giống nhau giữa các CDR tương ứng. Các trình tự khung vùng biến đổi của chuỗi kháng thể hoặc vùng hằng định của chuỗi kháng thể chủ yếu là từ trình tự khung vùng biến đổi của người hoặc vùng hằng định của người, tương ứng, khi ít nhất là 85%, 90%, 95% hoặc 100% các gốc tương ứng được xác định bởi Kabat là giống nhau. Để được phân loại là được làm tương thích với người theo định nghĩa về tên gốc quốc tế (INN) của Tổ chức Y tế thế giới (WHO) 2014 về các kháng thể được làm tương thích với người, một kháng thể phải có sự tương đồng ít nhất là 85% với các trình tự kháng thể dòng mầm của người (nghĩa là, trước quá trình siêu đột biến thân). Các kháng thể hỗn hợp là các kháng thể mà một chuỗi kháng thể (ví dụ, chuỗi nặng) thỏa mãn giới hạn nhưng chuỗi còn lại (ví dụ, chuỗi nhẹ) không thỏa mãn giới hạn này. Kháng thể được phân loại là khả năng nếu cả hai chuỗi đều không thỏa mãn 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 et al. (2016) The INNs and outs of antibody nonproprietary names, *mAbs* 8:1, 1-9, DOI: 10.1080/19420862.2015.1114320. Ngoài ra, xem “WHO-INN: International nonproprietary names (INN) for biological and biotechnological substances (a review)” (Internet) 2014. Có trên: <http://www.who.int/medicines/services/inn/BioRev2014.pdf>), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Để tránh 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 đồng nhất trình tự ít nhất là 85% với trình tự dòng mầm của người và một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỉ lệ đồng nhất trình tự ít hơn 85% với trình tự dòng mầm của người. Một số chuỗi nặng của kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỉ lệ đồng nhất trình tự từ khoảng 60% đến 100% với các trình tự dòng mầm của người, như, ví dụ, trong khoảng từ khoảng 60% đến 69%, 70% đến 79%, 80% đến 84%, hoặc 85% đến 89%. Một số chuỗi nặng nằm dưới định nghĩa INN của WHO 2014 và có, ví dụ, tỉ lệ đồng nhất trình tự khoảng 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, 82%, 83%, hoặc 84% với các trình tự dòng mầm của người, trong khi các chuỗi nặng khác thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 và có tỉ lệ đồng nhất trình tự khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89% hoặc lớn hơn với các trình tự dòng mầm của người. Một số chuỗi nhẹ của kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây có tỉ lệ đồng nhất trình tự từ khoảng 60% đến 100% với các trình tự dòng mầm của người, như, ví dụ, trong khoảng từ khoảng 80% đến 84%, hoặc 85% đến 89%. Một số chuỗi nhẹ nằm dưới định nghĩa INN của WHO 2014 và có, ví dụ, tỉ lệ đồng nhất trình tự khoảng 81%, 82%, 83%, hoặc 84% với các trình tự dòng mầm của người, trong khi các chuỗi nhẹ khác thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 và có tỉ lệ đồng nhất trình tự khoảng 85%, 86%, 87%, 88%, 89% hoặc lớn hơn với các trình tự dòng mầm của người. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây mà là "khảm" theo định nghĩa INN của WHO 2014 có các chuỗi nặng có tỉ lệ đồng nhất ít hơn 85% với trình tự dòng mầm của người được tạo cặp với các chuỗi nhẹ có tỉ lệ đồng nhất ít hơn 85% với các trình tự dòng mầm của người. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây là "hỗn hợp" theo định nghĩa INN của WHO 2014, ví dụ, có chuỗi nặng có tỉ lệ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% với các trình tự dòng mầm của người được tạo cặp với chuỗi nhẹ có tỉ lệ đồng nhất trình tự ít hơn 85% với các trình tự dòng mầm của người, hoặc ngược lại. Một số kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất ở đây thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 về "được làm tương thích với người" và có chuỗi nặng có tỉ lệ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% với trình tự dòng mầm người được tạo cặp với chuỗi nhẹ có tỉ lệ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% với các trình tự dòng mầm của người. Các kháng thể được lấy làm ví dụ thỏa mãn định nghĩa INN của WHO năm 2014 về "được làm tương

thích với người" bao gồm các kháng thể có chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:29 được tạo cặp với trình tự chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO:20, SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 hoặc SEQ ID NO:27. Các kháng thể được làm tương thích với người khác theo sáng chế bao gồm các kháng thể có chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO:15-27 được tạo cặp với chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO:28-30.

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

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

tránh được. Các vị trí của đột biến thể trong các CDR và của các axit amin cần thay thế cũng có thể được lựa chọn theo kinh nghiệm.

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

Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nặng là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là AAA18265.1 (SEQ ID NO:31). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nặng là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là ADW08092.1 (SEQ ID NO:32). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nặng là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ ID NO:33). IMGT# IGHV1-2*02 bao gồm các CDR CDR-H1 và CDR-H2 có cùng dạng chính tắc với chuỗi nặng 16G7 của chuột và là thành viên của phân nhóm 1 chuỗi nặng Kabat người. Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người có mã truy cập NCBI là AAB24404.1 (SEQ ID NO: 34). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người có mã truy cập NCBI là AEK69364.1 (SEQ ID NO: 35). Ví dụ về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO: 36). IMGT#IGKV4-1*01 có cùng các lớp chính tắc cho CDR-L1, CDR-L2 và CDR-L3 với 16G7 của chuột, và thuộc phân nhóm 1 kapa người.

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

Một số axit amin từ các gốc khung vùng biến đổi của người có thể được chọn để thay thế dựa vào ảnh hưởng có thể của chúng trên cấu hình CDR và/hoặc khả năng 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 đột biến thể hoặc sự đột biến của các axit amin cụ thể.

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

(1) liên kết trực tiếp không đồng hóa trị với kháng nguyên;

(2) là liền kề với vùng CDR hoặc nằm trong CDR như được xác định bởi Chothia mà không phải là Kabat;

(3) các tương tác khác 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 16G7 chuột bao gồm 13 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15), hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16), hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17), 16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18), hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19), hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO:20), hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21), hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22), hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23), hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24), hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25), hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26); hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27) và 3 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ: hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28), hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29), và hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30).

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

Các gốc khung từ các lớp (1) đến (3) như được xác định bởi Queen, US 5,530,101, đôi khi được gọi theo cách khác là các gốc chính tắc và vecnie. 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

tính chỉnh sự ăn khớp của kháng thể với kháng nguyên đôi khi được gọi là các gốc vecnie (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. Cũng là các ứng viên khác cho sự thể là các axit amin khung nhận của người mà là bất thường đối với globulin miễn dịch người ở vị trí đó. Các axit amin này có thể được thay thế bằng các axit amin từ vị trí tương đương của kháng thể cho của chuột hoặc từ các vị trí tương đương của các globulin miễn dịch người điển hình hơn.

Các gốc khung khác mà là ứng viên cho sự thể là các gốc glutamin đầu cùng N (Q) mà có thể được thay thế bằng axit glutamic (E) để làm giảm tối đa khả năng chuyển hóa pyroglutamat [Y. Diana Liu, et al., 2011, *J. Biol. Chem.*, 286: 11211–11217]. Sự chuyển hóa axit glutamic (E) thành pyroglutamat (pE) xảy ra chậm hơn so với từ glutamin (Q). Vì sự mất amin bậc một trong chuyển hóa glutamin thành pE, các kháng thể trở nên có tính axit hơn. Sự chuyển hóa không hoàn toàn tạo ra tính không đồng nhất trong kháng thể mà có thể quan sát được dưới dạng nhiều đỉnh bằng cách sử dụng các phương pháp phân tích dựa vào điện tích. Sự khác biệt về tính không đồng nhất có thể chỉ ra việc mất kiểm soát quy trình. Các kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ với các đột biến thể glutamin đầu cùng N thành glutamat là SEQ ID NO:15 (hu16G7VHv1), SEQ ID NO:16 (hu16G7VHv2), SEQ ID NO:17 (hu16G7VHv2a), SEQ ID NO:18 (16G7VHv2aB7), SEQ ID NO:19 (hu16G7VHv2b), SEQ ID NO:20 (hu16G7VHv2bH7), SEQ ID NO:21 (hu16G7VHv3), SEQ ID NO:22 (hu16G7VHv4), SEQ ID NO:23 (hu16G7VHv5V), SEQ ID NO:24 (hu16G7VHv5VR), và SEQ ID NO:27 (hu16G7VHv7).

Các kháng thể được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ là các dạng được làm tương thích với người của 16G7 của chuột, được ký hiệu là Hu16G7.

Kháng thể 16G7 của chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa lần lượt SEQ ID NO: 7 và SEQ ID NO:11. Sáng chế đề xuất 13 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b, hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR, hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b, và hu16G7VHv7. Sáng chế đề xuất thêm 3 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ: hu16G7VLv1, hu16G7VLv2,

và hu16G7VLv3. Fig.2 và 3 lần lượt thể hiện sự sắp xếp thẳng hàng của vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của các kháng thể 16G7 của chuột và nhiều kháng thể được làm tương thích với người khác nhau.

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 bắt thường về vị trí của nó trong trình tự vùng biến đổi của người và do đó có khả năng gây miễn dịch, có khả năng kết tụ, và các lý do khác, 33 vị trí khung vùng biến đổi sau đây được xem là ứng viên cho các đột biến thể trong 3 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ và 13 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người được lấy làm ví dụ, như được chỉ ra cụ thể hơn trong các ví dụ: L4 (M4L), L9 (D9S), L15 (L15V), L18 (R18K), L19 (A19V), L21 (I21M), L22 (N22S), L43 (P43S), L48 (I48M), H1 (Q1E), H5 (V5Q), H7 (S7P), H9 (A9S), H10 (E10V), H11 (V11L), H12 (K12V), H13 (K13R), H20 (V20L), H37 (V37A), H38 (R38K), H40 (A40R), H48 (M48I), H66 (R66K), H67 (V67K), H69 (M69L), H71 (R71V), H73 (T73I), H75 (I75S hoặc I75A), H80 (M80V), H82a (S82a-T), H82b (R82b-S), H83 (R83T), H85 (D85E). 3 vị trí CDR vùng biến đổi sau đây được xem là các ứng viên cho các đột biến thể trong 13 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người được lấy làm ví dụ, như được xác định cụ thể hơn trong các ví dụ: H31 (S31G), H60 (N60A), và H64 (K64Q).

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

Các kháng thể được lấy làm ví dụ bao gồm các hoán vị bất kỳ hoặc các tổ hợp của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành được lấy làm ví dụ, *ví dụ*, VHv1/VLv1, VHv1/VLv2, VHv1/VLv3, VHv2/VLv1, VHv2/VLv2, VHv2/VLv3, VHv2a/VLv1, VHv2a/VLv2, VHv2a/VLv3, VHv2aB7/VLv1, VHv2aB7/VLv2, VHv2aB7/VLv3, VHv2b/VLv1, VHv2b/VLv2, VHv2b/VLv3, VHv2bH7/VLv1, VHv2bH7/VLv2, VHv2bH7/VLv3, VHv3/VLv1, VHv3/VLv2, VHv3/VLv3,

VHv4/VLv1, VHv4/VLv2, VHv4/VLv3, VHv5/VLv1, VHv5/VLv2, VHv5/VLv3, VHv5VR/VLv1, VHv5VR/VLv2, VHv5VR/VLv3, VHv6a/VLv1, VHv6a/VLv2, VHv6a/VLv3, VHv6b/VLv1, VHv6b/VLv2, VHv6b/VLv3, VHv7/VLv1, VHv7/VLv2, hoặc VHv7/VLv3.

Sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỉ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b, hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR, hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b, và hu16G7VHv7 (SEQ ID NO: 15-27) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỉ lệ tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu16G7VLv1, hu16G7VLv2, và hu16G7VLv3 (SEQ ID NO: 28-30). Trong một số kháng thể này ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, hoặc toàn bộ 36 đột biến ngược hoặc các đột biến khác được tìm thấy trong SEQ ID NO:15-27 và SEQ ID NO:28-30 được giữ lại.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H5 bị chiếm bởi Q, H7 bị chiếm bởi P, H9 bị chiếm bởi S, H10 bị chiếm bởi V, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H13 bị chiếm bởi R, H20 bị chiếm bởi L, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H66 bị chiếm bởi K, H67 bị chiếm bởi A, H69 bị chiếm bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H73 bị chiếm bởi I, H75 bị chiếm bởi S, H80 bị chiếm bởi V, H82a bị chiếm bởi T, H82b bị chiếm bởi S, H83 bị chiếm bởi T, và H85 bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi, E, Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H5 bị chiếm bởi Q, H7 bị chiếm bởi P, H9 bị chiếm bởi S, H10 bị chiếm bởi V, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H13 bị chiếm bởi R, H20 bị chiếm bởi L,

H48 bị chiếm bởi I, H69 bị chiếm bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H82a bị chiếm bởi T, H82b bị chiếm bởi S, H83 bị chiếm bởi T, và H85 bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, T, S, T, và E.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H5 bị chiếm bởi Q, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H20 bị chiếm bởi L, H48 bị chiếm bởi I, H69 bị chiếm bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H82a bị chiếm bởi T, H82b bị chiếm bởi S, H83 bị chiếm bởi T, và H85 bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, L, V, T, S, T, và E.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H12 bị chiếm bởi V, H31 bị chiếm bởi G, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H60 bị chiếm bởi A, H69 bị chiếm bởi L, H73 bị chiếm bởi I, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H12, H31, H40, H48, H60, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, G, R, I, A, L, I, và T.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H12 bị chiếm bởi V, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H69 bị chiếm bởi L, H73 bị chiếm bởi I, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H12 bị chiếm bởi V, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H66 bị chiếm bởi K, H67 bị chiếm bởi A, H69 bị chiếm bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H73 bị chiếm bởi I, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người,

các vị trí H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, K, A, L, V, I, và T.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H12 bị chiếm bởi V, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H69 bị chiếm bởi L, H73 bị chiếm bởi I, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H7 bị chiếm bởi P, H71 bị chiếm bởi V, và H73 bị chiếm bởi I. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H7, H71, và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi P, V, và I.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H31 bị chiếm bởi G và H60 bị chiếm bởi A. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H31 và H60 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi G và A.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H12, H31, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, V, G, R, I, A, K, A, L, V, I, và T.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H7, H71, và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, P, V và I.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi Q hoặc E, H5 bị chiếm bởi V hoặc Q, H7 bị chiếm bởi S hoặc P, H9 bị chiếm bởi A hoặc S, H10 bị chiếm bởi E hoặc V, H11 bị chiếm bởi V hoặc L, H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H13 bị chiếm bởi K hoặc R, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H31 bị chiếm bởi G hoặc S, H37 bị chiếm bởi V hoặc A, H 38 bị chiếm bởi R hoặc K, H40 bị chiếm bởi A hoặc R, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H60 bị chiếm bởi A hoặc N, H64 bị chiếm bởi Q hoặc K, H66 bị chiếm bởi R hoặc K, H67 bị chiếm bởi V hoặc A, H69 bị chiếm bởi M

hoặc L, H71 bị chiếm bởi R hoặc V, H73 bị chiếm bởi T hoặc I, H75 bị chiếm bởi I, S, hoặc A, H80 bị chiếm bởi M hoặc V, H82a bị chiếm bởi S hoặc T, H82b bị chiếm bởi R hoặc S, H83 bị chiếm bởi R hoặc T, và H85 bị chiếm bởi D hoặc E.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H37, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, A, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E như trong hu16G7VHv1. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, L, V, A, T, S, T, và E, như trong hu16G7VHv2. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, K, A, L, V, I, và T như trong hu16G7VHv2a. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H12, H31, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, G, R, I, A, K, A, L, V, I, và T như trong hu16G7VHv2aB7. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T như trong hu16G7VHv2b. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H12, H31, H40, H48, H60, H64, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, G, R, I, A, Q, L, I, và T, như trong hu16G7VHv2bH7. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, A, T, S, T, và E như trong hu16G7VHv3. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H11, H12, H20, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, K, A, L, V, I, S, T, S, T, và E như trong hu16G7VHv4. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73I, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E, như trong hu16G7VHv5V. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71,

H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E như trong hu16G7VHv5VR. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H7, H71, và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi P, V, và I, như trong hu16G7VHv6a. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, vị trí H71 trong vùng VH bị chiếm bởi V, như trong hu16G7VHv6b. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí H1, H7, H71, và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, P, V, và I, như trong hu16G7VHv7.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, chuỗi nặng biến đổi có tỉ lệ đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, chuỗi nhẹ biến đổi có tỉ lệ đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có tỉ lệ đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9, và 10) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13, và 14); với điều kiện là vị trí H31 bị chiếm bởi S hoặc G, vị trí H60 bị chiếm bởi N hoặc A và vị trí 64 bị chiếm bởi K hoặc Q. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 49. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 50. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 51.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L4 bị chiếm bởi L, L9 bị chiếm bởi S, L15 bị chiếm bởi V, L22 bị chiếm bởi S, và L43 bị chiếm bởi S. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí L4, L9, L15, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, S, và S.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L4 bị chiếm bởi L, L9 bị chiếm bởi S, L15 bị chiếm bởi V, L18 bị chiếm bởi K, L19 bị chiếm bởi V, L21 bị chiếm bởi M, L22 bị chiếm bởi S, và L43 bị chiếm bởi S. Trong một số

kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, K, V, M, S, và S.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L4 bị chiếm bởi M hoặc L, L9 bị chiếm bởi D hoặc S, L15 bị chiếm bởi L hoặc V, L18 bị chiếm bởi R hoặc K, L19 bị chiếm bởi A hoặc V, L21 bị chiếm bởi I hoặc M, L22 bị chiếm bởi N hoặc S, L43 bị chiếm bởi P hoặc S, và L48 bị chiếm bởi I hoặc M.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, K, V, M, S, và S, như trong hu16G7VLv1. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí L4, L9, L15, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, S, và S, như trong hu16G7VLv2. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, các vị trí L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, K, V, M, S, và S, như trong hu16G7VLv3.

Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, chuỗi nặng biến đổi có tỉ lệ đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, chuỗi nhẹ biến đổi có tỉ lệ đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự người. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có tỉ lệ đồng nhất $\geq 85\%$ với trình tự dòng mầm của người. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, ba CDR chuỗi nặng là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, 9, và 10) và ba CDR chuỗi nhẹ là như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, 13, và 14); với điều kiện là vị trí H31 bị chiếm bởi S hoặc G, vị trí H60 bị chiếm bởi N hoặc A và vị trí 64 bị chiếm bởi K hoặc Q. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 49. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 50. Trong một số kháng thể 16G7 được làm tương thích với người, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 51.

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 16G7. Các vùng CDR có thể được xác

định bằng định nghĩa thông thường bất kỳ (ví dụ, Chothia, hoặc tổ hợp của Chothia và Kabat) nhưng tốt hơn, nếu được xác định bởi Kabat.

Các vị trí khung vùng biến đổi là theo cách đánh số Kabat trừ khi có quy định khác. Các biến thể khác này thường khác với các trình tự của các chuỗi nặng và nhẹ Hu16G7 được lấy làm ví dụ ở một số lượng nhỏ (ví dụ, thường là không nhiều hơn 1, 2, 3, 5, 10, hoặc 15) các đột biến thế, đột biến mất đoạn hoặc đột biến gán xen. Các khác biệt này thường nằm trong khung nhưng cũng có thể xảy ra trong các CDR.

Khả năng biến đổi thêm trong các biến thể 16G7 được làm tương thích với người là các đột biến ngược bổ sung trong các khung vùng biến đổi. Nhiều gốc khung không tiếp xúc với các CDR trong mAb được làm tương thích với người có thể chứa các đột biến thế của các axit amin từ các vị trí tương ứng của mAb cho của chuột hoặc các kháng thể của người hoặc chuột khác, và thậm chí nhiều gốc tiếp xúc-CDR tiềm năng cũng có thể thích hợp để thay thế. Ngay cả các axit amin trong các CDR có thể được thay đổi, ví dụ, với các gốc được phát hiện ở vị trí tương ứng của trình tự nhận của người được sử dụng để cung cấp các khung vùng biến đổi. Ngoài ra, các trình tự nhận của người khác có thể được sử dụng, ví dụ, cho chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Nếu các trình tự nhận khác nhau được sử dụng, một hoặc nhiều trong số các đột biến ngược đã đề cập trên đây có thể không được thực hiện vì các gốc cho và nhận tương ứng đã là giống nhau mà không cần các đột biến ngược.

Tốt hơn, nếu sự thay thế hoặc các đột biến ngược trong các biến thể 16G7 được làm tương thích với người (được bảo tồn hoặc không) không có tác động đáng kể đối với ái lực liên kết hoặc hiệu lực của mAb được làm tương thích với người, nghĩa là, khả năng liên kết với tau của nó.

Các kháng thể 16G7 được làm tương thích với người còn được đặc trưng bởi khả năng liên kết của chúng với cả tau được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau.

Kháng thể khảm và được ngụy trang

Sáng chế đề xuất thêm các dạng khảm và được ngụy trang của các kháng thể không phải của người, cụ thể là các kháng thể 16G7 trong các ví dụ.

Kháng thể khảm là kháng thể trong đó các vùng biến đổi trưởng thành của các chuỗi nhẹ và nặng của kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) được kết hợp với các vùng hằng định chuỗi nhẹ và nặng của người. Các kháng thể này gần như hoặc hoàn toàn giữ được tính đặc hiệu liên kết của kháng thể chuột, và là khoảng hai phần ba trình tự của người. Trong một phương án, kháng thể 16G7 khảm có trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO: 54 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:55.

Kháng thể được ngụy trang là một loại kháng thể được làm tương thích với người mà vẫn giữ được một số và thường là toàn bộ các CDR và một số gốc khung vùng biến đổi không phải của người của kháng thể không phải của người nhưng thay thế các gốc khung vùng biến đổi khác mà có thể tham gia vào các epitop tế bào B hoặc T, ví dụ các gốc được bộc lộ (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) với các gốc từ các vị trí tương ứng của trình tự kháng thể người. Kết quả là một kháng thể trong đó các CDR hoàn toàn hoặc gần như là từ kháng thể không phải của người và các khung vùng biến đổi của kháng thể không phải của người được làm cho giống của người hơn nhờ các đột biến thể này. Các dạng được ngụy trang của kháng thể 16G7 được bao gồm trong sáng chế.

Các kháng thể người

Các kháng thể người kháng tau hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 55-78, 60-75, 61-70, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO: 3, lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 113-136, 118-133, 119-128, 113-127, hoặc 122-136, của SEQ ID NO:1) được tạo ra bởi nhiều kỹ thuật khác nhau được mô tả dưới đây. Một số kháng thể người được chọn lọc bằng các thí nghiệm liên kết cạnh tranh, bằng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn của Winter, trên đây, hoặc theo cách khác, để có cùng tính đặc hiệu epitop với kháng thể chuột cụ thể, chẳng hạn như một trong số các kháng thể đơn dòng của chuột được mô tả trong các ví dụ. Các kháng thể người cũng có thể được sàng lọc về tính đặc hiệu epitop cụ thể bằng cách chỉ sử dụng một đoạn của tau, như đoạn tau chỉ chứa, các gốc axit amin 55-78, 60-75, 61-70, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO: 3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 113-136, 118-133, 119-128, 113-127, hoặc 122-136, của SEQ ID NO:1), làm kháng nguyên đích, và/hoặc bằng cách sàng lọc các kháng thể kháng tập hợp các biến thể tau, như các biến thể tau chứa nhiều đột biến khác nhau trong các gốc axit amin 55-78, 60-75, 61-70, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO: 3 (lần lượt tương ứng

với các gốc axit amin 113-136, 118-133, 119-128, 113-127, hoặc 122-136 của SEQ ID NO:1).

Các quy trình sản sinh kháng thể người bao gồm phương pháp trioma của Oestberg *et al.*, *Hybridoma* 2:361-367 (1983); Oestberg, patent Mỹ số 4,634,664; và Engleman *et al.*, Patent Mỹ số 4,634,666, sử dụng chuột chuyển gen bao gồm các gen globulin miễn dịch người (*xem, ví dụ, Lonberg et al.*, WO93/12227 (1993); US 5,877,397; US 5,874,299; US 5,814,318; US 5,789,650; US 5,770,429; US 5,661,016; US 5,633,425; US 5,625,126; US 5,569,825; US 5,545,806; Neuberger, *Nat. Biotechnol.* 14:826 (1996); và Kucherlapati, WO 91/10741 (1991)) các phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn (*xem, ví dụ, Dower et al.*, WO 91/17271; McCafferty *et al.*, WO 92/01047; US 5,877,218; US 5,871,907; US 5,858,657; US 5,837,242; US 5,733,743; và US 5,565,332); và các phương pháp được mô tả trong WO 2008/081008 (ví dụ, làm bất tử dòng tế bào B nhớ được phân lập từ người, ví dụ, bằng EBV, sàng lọc về các đặc điểm mong muốn, và tách dòng và biểu hiện các dạng tái tổ hợp).

Lựa chọn vùng hằng định

Các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể khảm, được nguy trang hoặc được làm tương thích với người có thể được liên kết với ít nhất một phần của vùng hằng định của người. Việc chọn vùng hằng định một phần tùy thuộc vào tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, tác dụng thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể và/hoặc tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể có được mong muốn hay không. Ví dụ, các isotyp IgG1 và IgG3 của người có tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể và các isotyp IgG2 và IgG4 của người thì không. IgG1 và IgG3 của người cũng cảm ứng các chức năng hiệu ứng qua trung gian tế bào mạnh hơn so với IgG2 và IgG4 của người. Các vùng hằng định chuỗi nhẹ có thể là lambda hoặc kapa. Các quy ước đánh số cho vùng hằng định bao gồm cách đánh số EU (Edelman, G.M. et al., *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. et al., 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, *supra*).

Một hoặc một số axit amin ở các đầu cùng amino hoặc carboxy của chuỗi nhẹ và/hoặc nặng, chẳng hạn như lysin đầu cùng C của chuỗi nặng, có thể bị khuyết hoặc được tạo dẫn xuất ở một phần hoặc toàn bộ phân tử. Các đột biến thể có thể được tạo ra trong vùng hằng định để làm giảm hoặc làm tăng chức năng hiệu ứng như tác dụng gây độc tế bào qua trung gian bổ thể hoặc ADCC (xem tài liệu, ví dụ, Winter et al., patent Mỹ số 5,624,821; Tso et al., Patent Mỹ số 5,834,597; và Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), hoặc để kéo dài thời gian bán thải ở người (xem tài liệu, ví dụ, Hinton et al., J. Chem. 279:6213, 2004). Các đột biến thể được lấy làm ví dụ bao gồm Gln ở vị trí 250 và/hoặc Leu ở vị trí 428 (cách đánh số EU được sử dụng trong đoạn này cho vùng hằng định) để làm tăng thời gian bán thải của kháng thể. Đột biến thể ở bất kỳ hoặc toàn bộ các vị trí 234, 235, 236 và/hoặc 237 làm giảm ái lực đối với các thụ thể Fc γ , cụ thể là thụ thể Fc γ RI (xem, ví dụ, US 6,624,821). Đột biến thể alanin ở các vị trí 234, 235, và 237 của IgG1 người có thể được sử dụng để làm giảm chức năng hiệu ứng. Một số kháng thể có đột biến thể alanin ở các vị trí 234, 235 và 237 của IgG1 người để làm giảm chức năng hiệu ứng. Tùy ý, các vị trí 234, 236 và/hoặc 237 ở IgG2 của người được thay thế bằng alanin và vị trí 235 bằng glutamin (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,624,821). Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329, và 331 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 318, 320, và 322 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và/hoặc 235 được thay thế bằng alanin và/hoặc vị trí 329 được thay thế bằng glyxin. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và 235 được thay thế bằng alanin. Trong một số kháng thể, isotyp này là IgG2 hoặc IgG4 người.

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

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

Biểu hiện kháng thể tái tổ hợp

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

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

Trong một phương pháp tiếp cận, các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được thao tác di truyền lại để mã hóa các trình tự cho cắt nối xuôi dòng của các khớp nối VDJ hoặc VJ tương ứng và được tách dòng vào vectơ biểu hiện động vật có vú, như pCMV-hy1 đối với chuỗi nặng và pCMV-Mcl đối với chuỗi nhẹ. Các vectơ này mã hóa các vùng hằng định $\gamma 1$ và Ck của người như các đoạn exon xuôi dòng của caset vùng biến đổi đã

được gắn xen. Sau khi kiểm tra trình tự, 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 nguy trang, được làm tương thích với người, và kháng thể người thường được tạo ra bằng cách biểu hiện tái tổ hợp. Các cấu trúc polynucleotit tái tổ hợp thường bao gồm trình tự kiểm soát biểu hiện được liên kết chức năng với các trình tự mã hóa của các chuỗi kháng thể, bao gồm các yếu tố kiểm soát biểu hiện khác loại hoặc được kết hợp tự nhiên, 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 được trong các sinh vật chủ như là các episom hoặc như một phần nguyên vẹn của ADN nhiễm sắc thể vật chủ. Thông thường, các vector biểu hiện chứa gen đánh dấu lựa chọn, ví dụ, 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 sinh vật, chẳng hạn như nấm men, cũng là hữu ích cho việc biểu hiện. *Saccharomyces* là vật chủ nấm men với các vector thích hợp có các trình tự kiểm soát biểu hiện, gốc sao chép, các trình tự kết thúc, và các yếu tố tương tự nếu muốn. Các trình tự khởi động điển hình bao gồm 3-phosphoglyxerat kinaza và các enzym thủy phân đường khác. Các trình tự khởi động nấm men cảm ứng được bao gồm, trong số các loại khác, các trình tự khởi động từ alcohol dehydrogenaza, isoxytocrom C, và các enzym chịu trách nhiệm về việc sử dụng maltoza và galactoza.

Các tế bào động vật có vú có thể được sử dụng để biểu hiện các đoạn nucleotit mã hóa các globulin miễn dịch hoặc các đoạn của chúng. Xem Winnacker, From Genes to

Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). Nhiều dòng tế bào chủ thích hợp có khả năng tiết ra các protein khác loại không hoạt động đã được phát triển, và bao gồm các dòng tế bào CHO, nhiều dòng tế bào COS khác nhau, các tế bào HeLa, các tế bào HEK293, các tế bào L, và các tế bào u tủy không sản sinh kháng thể bao gồm Sp2/0 và NS0. Các tế bào này có thể không phải của người. Các vectơ biểu hiện cho các tế bào này có thể bao gồm các trình tự kiểm soát biểu hiện, như gốc sao chép, trình tự khởi động, trình tự tăng cường (Queen *et al.*, *Immunol. Rev.* 89:49 (1986)), và các vị trí thông tin xử lý cần thiết, như các vị trí liên kết ribosom, các vị trí cắt nối ARN, các vị trí polyadenyl hóa, và các trình tự kết thúc phiên mã. Các trình tự kiểm soát biểu hiện có thể bao gồm các trình tự khởi động thu được từ các gen nội sinh, cytomegalovirus, SV40, adenovirus, bovine papillomavirus, và tương tự. Xem Co *et al.*, *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 chuỗi nặng được liên kết chức năng với trình tự khởi động và trình tự tăng cường từ gen đặc hiệu tuyến vú, như casein hoặc beta lactoglobulin.

Các 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, kỹ thuật bắn gen, hoặc chuyển nhiễm dựa vào virus có thể được sử dụng cho các tế bào chủ khác. Các phương pháp khác được sử dụng để biến nạp tế bào động vật có vú bao gồm sử dụng polybrene, dung hợp tế bào trần, liposom, xung điện, và tiêm tế bào. Để tạo ra các động vật chuyển gen, các gen chuyển có thể được tiêm tế bào vào noãn bào đã thụ tinh hoặc có thể được đưa vào bộ gen của tế bào gốc phôi, và nhân của các tế bào này được chuyển vào noãn bào đã được khoét nhân.

(Các) vectơ mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể được đưa vào môi trường nuôi cấy tế bào, các phần góp tế bào có thể được sàng lọc về năng suất phát triển và chất lượng sản phẩm trong môi trường không chứa huyết thanh. Sau đó, các phần góp tế bào có năng suất cao nhất có thể được tách dòng tế bào đơn lẻ dựa vào FACS để tạo ra các dòng đơn dòng. Năng suất cụ thể trên 50 pg hoặc 100 pg mỗi tế bào mỗi ngày, mà

tương ứng với các hiệu giá sản phẩm lớn hơn 7,5 g/L môi trường nuôi cấy, có thể được sử dụng. Các kháng thể được sinh ra bởi các dòng tế bào đơn lẻ cũng có thể được kiểm tra về độ đục, các đặc điểm lọc, PAGE, IEF, quét UV, HP-SEC, lập bản đồ hydrat cacbon-oligosacarit, đo phổ khối lượng, và thử nghiệm liên kết, chẳng hạn như ELISA hoặc Biacore. Sau đó dòng được chọn có thể được đưa vào nhiều lọ thủy tinh và được bảo quản đông lạnh để sử dụng tiếp.

Khi đã được biểu hiện, các kháng thể có thể được tinh chế theo các quy trình chuẩn trong lĩnh vực này, bao gồm bất 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).

Kháng nguyên hoạt động

Chất được sử dụng để gây miễn dịch chủ động có tác dụng cảm ứng ở bệnh nhân cùng loại kháng thể được mô tả liên quan đến gây miễn dịch thụ động trên đây. Các chất được sử dụng để gây miễn dịch chủ động có thể là cùng các loại kháng nguyên được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng ở động vật thí nghiệm, *ví dụ*, peptit chứa 3-15 hoặc 3-12 hoặc 5-12, hoặc 5-8 axit amin liền kề từ một vùng của tau tương ứng với các gốc 55-78, 60-75, 61-70, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO: 3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 113-136, 118-133, 119-128, 113-127, hoặc 122-136, của SEQ ID NO:1), như, *ví dụ*, peptit bao gồm các gốc 55-78, 60-75, 61-70, 55-69, hoặc 64-78 của SEQ ID NO: 3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 113-136, 118-133, 119-128, 113-127, hoặc 122-136, của SEQ ID NO:1). Để cảm ứng các kháng thể liên kết với cùng một epitop hoặc epitop gối lên nhau với 16G7, 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 tau). Sau đó một đoạn của tau bao gồm hoặc chứa hoặc gối lên

epitop này có thể được sử dụng làm kháng nguyên. Các đoạn này thường được sử dụng ở dạng không được phosphoryl hóa.

Chất mang và tá dược khác loại, nếu được sử dụng có thể là giống như được sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng, nhưng cũng có thể được chọn vì thích hợp hơn để làm thuốc để sử dụng cho người. Các chất mang thích hợp bao gồm albumin huyết thanh, hemoxyanin của loài ốc keyhole limpet, các phân tử globulin miễn dịch, thyroglobulin, albumin trứng, biến độc tố uốn ván, hoặc biến độc tố từ vi khuẩn gây bệnh khác, như vi khuẩn gây bệnh bạch hầu (ví dụ, CRM197), *E. coli*, tả, hoặc *H. pylori*, hoặc dẫn xuất độc tố nhược động. Các epitop tế bào T cũng là các phân tử mang thích hợp. Một số thể liên hợp có thể được tạo ra bằng cách liên kết các chất theo sáng chế với phân tử polyme kích thích miễn dịch (ví dụ, tripalmitoyl-S-glyxerin xystein (Pam₃Cys), mannan (polyme mannoza), hoặc glucan (polyme α β 1 \rightarrow 2)), xytokin (ví dụ, peptit IL-1, IL-1 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 đệm (ví dụ, gly-gly). Các chất mang khác bao gồm các hạt tương tự virus. Các hạt tương tự virus (VLP), còn được gọi là virion giả hoặc các hạt thu được từ virus, là các cấu trúc dưới đơn vị chứa nhiều bản sao của protein vỏ capsit và/hoặc protein vỏ ngoài virus có khả năng tự lắp ráp thành các VLP có cấu trúc đối xứng hình cầu xác định trên in vivo. (Powilleit, et al., (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 et al, 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 sử 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 tau 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 được ưu tiên hơn bao gồm các muối nhôm, như nhôm hydroxit và nhôm phosphat, 3 De-O-axyl hóa monophosphoryl lipid A (MPLTM) (xem GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, hiện nay là một phần của Corixa). StimulonTM 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 *et al.*, trong *Vaccine Design: The Subunit and Adjuvant Approach* (eds. Powell & Newman, Plenum Press, NY, 1995); US 5,057,540), (Aquila BioPharmaceuticals, Framingham, MA; now Antigenics, Inc., New York, NY). Các tá được khác là các nhũ tương dầu trong nước (như squalen hoặc dầu lạc), tùy ý kết hợp với các chất kích thích miễn dịch, như monophosphoryl lipid A (xem Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), các polyme pluronic, và vi khuẩn mycobacterium bị diệt. Các tá được Ribi là các nhũ tương dầu trong nước. Ribi chứa dầu chuyển hóa được (squalen) được tạo nhũ tương với nước muối chứa Tween 80. Ribi còn chứa các sản phẩm mycobacterium được tinh chế mà có tác dụng làm chất kích thích miễn dịch và monophosphoryl lipid A của vi khuẩn. Một tá được khác là CpG (WO 98/40100). Các tá được có thể được sử dụng làm thành phần của được phẩm cùng với hoạt chất hoặc có thể được sử dụng riêng, trước, đồng thời với, hoặc sau khi sử dụng được chất.

Các dạng tương tự của các đoạn tự nhiên của tau mà cảm ứng các kháng thể kháng tau cũng có thể được sử dụng. Ví dụ, một hoặc nhiều hoặc toàn bộ các L-axit amin có thể được thế bằng D axit amin trong các peptit này. Ngoài ra, thứ tự của các axit amin có thể được bảo tồn (retro peptit). Tùy ý một peptit bao gồm tất cả các D-axit amin theo thứ tự bảo tồn (retro-inverso peptit). Các peptit và các hợp chất khác mà không nhất thiết phải có sự tương đồng trình tự axit amin đáng kể với các peptit tau nhưng đóng vai trò là các giả peptit tau và gây ra đáp ứng miễn dịch tương tự. Các kháng thể kháng idiotyp kháng các kháng thể đơn dòng với tau như được mô tả trên đây cũng có thể được sử dụng. Các kháng thể kháng Id này 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 gây ra 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 sớm trung gian chính CMV và yếu tố 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 vectơ. 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 vectơ 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 vectơ adenovirus {xem, *ví dụ*, Bett et al, *J. Virol.* 67, 591-1 (1993)}; vectơ virus liên hợp adeno {xem, *ví dụ*, Zhou et al., *J. Exp. Med.* 179, 1867 (1994)}, các vectơ virus từ họ pox bao gồm các vaccinia virus và pox virus ở chim, các vectơ virus từ giống virus alpha như các vectơ thu được từ Sindbis và Semliki Forest Virus (xem, *ví dụ*, Dubensky et al., *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 et al., *Human Gene Therapy* 6, 325-333 (1995); Woo et al, WO 94/12629 và Xiao & Brandsma, *Nucleic Acids. Res.* 24, 2630-2622 (1996)).

ADN mã hóa kháng nguyên, hoặc vectơ 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 vectơ 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 et al., *J. Micro Encap.* 1996).

Các thử nghiệm sàng lọc kháng thể

Các kháng thể có thể được sàng lọc ban đầu về tính đặc hiệu liên kết dự kiến như được mô tả trên đây. Các kháng nguyên hoạt động cũng có thể được sàng lọc tương tự 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.

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

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

Động vật chuyển gen được lấy làm ví dụ là dòng K3 của chuột (Itner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 105(41):15997-6002 (2008)). Các chuột này có gen chuyển tau người với đột biến K 369 I (đột biến liên quan đến bệnh Pick) và trình tự khởi động Thy 1.2. Mô hình này thể hiện sự thoái hóa thần kinh, thiếu vận động và thoái hóa các sợi hướng tâm và các tế bào hạt tiểu não trong khoảng thời gian ngắn. Động vật khác điển hình là dòng chuột JNPL3. Chuột có gen chuyển tau người với đột biến P301L (đột biến này liên quan đến bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương) và trình tự khởi động Thy 1.2 (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, et al., Nat Genet. 25:402-405 (2000)). Các chuột này có khoảng thời gian thoái hóa thần kinh đều đặn hơn. Chuột phát triển các đám rối thần kinh trong một số vùng não và dây rốn, mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ). Đây là mô hình hoàn hảo để nghiên cứu các hậu quả của sự phát triển đám rối

và cho liệu pháp sàng lọc mà có thể ức chế sự tạo thành các khối kết tụ này. Ưu điểm khác của các động vật này là sự tấn công của bệnh tương đối sớm. Trong dòng đồng hợp tử, các bất thường về hành vi liên quan đến bệnh học tau có thể được quan sát thấy ở sớm nhất là 3 tháng, nhưng các động vật vẫn tương đối khỏe mạnh ít nhất đến 8 tháng tuổi. Nói cách khác, ở 8 tháng tuổi, các động vật đi loanh quanh, tự ăn, và có thể thực hiện các nhiệm vụ hành vi đủ tốt để cho phép theo dõi được tác dụng điều trị. Việc gây miễn dịch chủ động cho các con chuột này trong 6-13 tháng bằng - AI wI KLH-PHF-1 tạo ra các hiệu giá khoảng 1.000 và thể hiện cá đám rối thần kinh ít hơn, pSer422 ít hơn, và sự sụt cân được giảm đi so với chuột đối chứng không được điều trị.

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

Các bệnh nhân phù hợp với việc điều trị

Sự có mặt của các đám rối thần kinh đã được phát hiện ra ở một số bệnh bao gồm bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền

(CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), và bệnh liệt trên nhân tiền triển (PSP). Các phác đồ này cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bất kỳ trong số các bệnh này. Do mối liên quan rộng giữa các tình trạng và bệnh thần kinh và tau, các phác đồ hiện nay có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa cho đối tượng bất kỳ thể hiện các mức nồng độ tau hoặc tau được phosphoryl hóa gia tăng (ví dụ, trong CSF) so với giá trị trung bình ở các cá thể không bị bệnh thần kinh. Các phác đồ này cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thần kinh ở các cá thể có đột biến ở tau liên quan đến bệnh thần kinh. Các phương pháp này là đặc biệt thích hợp để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer, và cụ thể là ở các bệnh nhân.

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

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

Các axit nucleic

Sáng chế đề cập thêm đến các axit nucleic mã hóa bất kỳ trong số các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được mô tả trên đây (ví dụ, SEQ ID NO:7 và SEQ ID NO:11). 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. Các trình tự axit nucleic mã hóa có thể được liên kết chức năng với các trình tự điều hòa để đảm bảo sự biểu hiện của các trình tự mã hóa, chẳng hạn như trình tự khởi động, yếu tố tăng cường, vị trí liên kết ribosom, tín hiệu kết thúc phiên mã, và tương tự. Các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ có thể xuất hiện ở dạng được phân lập hoặc có thể được tách dòng vào một hoặc nhiều vector. Các axit nucleic này có thể được tổng hợp bằng, ví dụ, phương pháp tổng hợp trạng thái rắn hoặc PCR của các oligonucleotit gộp lên nhau. Các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ có thể được nối thành một axit nucleic liền kề, ví dụ, trong một vector biểu hiện, hoặc có thể là riêng biệt, ví dụ, mỗi axit nucleic được tách dòng vào vector biểu hiện riêng của nó.

Kháng thể liên hợp

Các kháng thể liên hợp mà liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên như tau, là hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của tau; theo dõi và đánh giá hiệu quả của các dược chất đang được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ

với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP); ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ của tau; ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi tau; làm giảm hoặc làm sạch các lắng đọng tau; ổn định cấu hình không độc của tau; hoặc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ura bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) ở bệnh nhân.

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

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

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

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

Một số kháng thể này có thể được liên kết với các đồng vị phóng xạ. Ví dụ về các đồng vị phóng xạ bao gồm, ví dụ, yttri⁹⁰ (90Y), indium¹¹¹ (111In), ¹³¹I, ^{99m}Tc, bạc phóng xạ-111, bạc phóng xạ-199, và Bismut²¹³. Sự liên kết các đồng vị phóng xạ với các kháng thể có thể được thực hiện 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 et al., Cell Biophys. 24-25:1-7 (1994).* Liên kết của các đồng vị phóng xạ bạc có thể bao gồm phản ứng khử globulin miễn dịch bằng axit ascorbic. Đối với các đồng vị phóng xạ như 111In và 90Y, ibritumomab tiuxetan có thể được sử dụng và sẽ phản ứng với các chất đồng vị này để lần lượt tạo ra 111In-ibritumomab tiuxetan và 90Y-

ibrutumomab tiuxetan. Xem Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

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

Các kháng thể cũng có thể được kết hợp với các protein khác. Ví dụ, các kháng thể có thể được kết hợp với các Fynomer. Fynomer là các protein liên kết nhỏ (ví dụ, 7 kDa) thu được từ 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 có 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 đầu cùng N và/hoặc đầu cùng C của các kháng thể để tạo ra FynomAb đặc hiệu kép và đặc hiệu ba với các cấu trúc khác nhau. Các Fynomer có thể được lựa chọn bằng cách sử dụng các thư viện Fynomer 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. Các ví dụ về Fynomer được mô tả trong Grabulovski *et al.*, *J. Biol. Chem.* 282:3196-3204 (2007); Bertschinger *et al.*, *Protein Eng. Des. Sel.* 20:57-68 (2007); Schlatter *et al.*, *MAbs.* 4:497-508 (2011); Banner *et al.*, *Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr.* 69(Pt6):1124-1137 (2013); and Brack *et al.*, *Mol. Cancer Ther.* 13:2030-2039 (2014).

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

Các kháng thể cũng có thể được kết hợp với nhãn phát hiện được. Các kháng thể này có thể được sử dụng, ví dụ, để chẩn đoán bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ura bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP), và/hoặc để đánh giá tác dụng điều trị. Các kháng thể này là đặc biệt hữu ích để thực hiện các kỹ thuật xác định này ở đối tượng mắc hoặc dễ bị mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ura bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP), 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 bao gồm nhiều enzym khác nhau, như peroxidaza cây cải ngựa, phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; các nhóm giả, như streptavidin/biotin và avidin/biotin; các nguyên liệu huỳnh quang, như umbelliferone, floresxein, floresxein isothioxyanat, rođamin, diclotriazinylamin floresxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; các nguyên liệu phát quang, như luminol; các nguyên liệu phát quang sinh học, như luciferaza, luxiferin, và aequorin; các nguyên liệu hoạt động phóng xạ, như bạc phóng xạ-111, bạc phóng xạ-199, Bismuth²¹³, iot (¹³¹I, ¹²⁵I, ¹²³I, ¹²¹I), cacbon (¹⁴C), lưu huỳnh (⁵S), triti (³H), indium (¹¹⁵In, ¹¹³In, ¹¹²In, ¹¹¹In), tecneti (⁹⁹Tc), taliu (²⁰¹Ti), gali (⁶⁸Ga,

^{67}Ga), paladi (^{103}Pd), molybden (^{99}Mo), xenon (^{133}Xe), flo (^{18}F), ^{153}Sm , ^{177}Lu , ^{159}Gd , ^{149}Pm , ^{140}La , ^{175}Yb , ^{166}Ho , ^{90}Y , ^{47}Sc , ^{186}Re , ^{188}Re , ^{142}Pr , ^{105}Rh , ^{97}Ru , ^{68}Ge , ^{57}Co , ^{65}Zn , ^{85}Sr , ^{32}P , ^{153}Gd , ^{169}Yb , ^{51}Cr , ^{54}Mn , ^{75}Se , ^{113}Sn , và ^{117}In ; 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 kết với các đồng vị phóng xạ đặc hiệu.

Sự liên kết các đồng vị phóng xạ với các kháng thể có thể được thực hiện bằng các chelat hai chức thông thường. Đối với liên kết bạc phóng xạ-111 và bạc phóng xạ-199, các cầu nối dựa trên lưu huỳnh có thể được sử dụng. Xem Hazra *et al.*, *Cell Biophys.* 24-25:1-7 (1994). Liên kết của các đồng vị phóng xạ bạc có thể bao gồm việc khử globulin miễn dịch bằng axit ascorbic. Đối với các đồng vị phóng xạ 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 1:S91-S95 (2001).

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

Dược phẩm và phương pháp sử dụng

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

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

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

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

sử dụng nhiều liều trong một khoảng thời gian dài, ví dụ, ít nhất là 6 tháng. Các phác đồ điều trị được lấy làm ví dụ khác đòi hỏi sử dụng hai tuần một lần hoặc một tháng một lần hoặc 3 đến 6 tháng một lần.

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

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

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

phân tán. Các kháng thể khác có thể là ở dạng đông khô để hoàn nguyên với tá dược lỏng thích hợp, ví dụ, nước tiệt trùng không chứa chất gây sốt.

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

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

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

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

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

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

Phương pháp theo dõi và chẩn đoán

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

Sáng chế đề xuất các phương pháp chụp ảnh in vivo các lắng đọng protein tau (ví dụ, các đám rối thần kinh và các thể vùi tau) ở bệnh nhân. Phương pháp này hoạt động bằng cách sử dụng chất phản ứng, như kháng thể liên kết với tau (*ví dụ*, kháng thể 16G7 của chuột, được làm tương thích với người, khảm hoặc nguy trang), cho bệnh nhân và sau đó phát hiện chất này sau khi nó được liên kết. Trong một số phương pháp, kháng thể này liên kết với epitop của tau trong các gốc axit amin 55-78 của SEQ ID NO:3 (tương ứng với các gốc axit amin 113-136 của SEQ ID NO:1). Trong các phương pháp này, kháng thể liên kết với epitop trong các gốc axit amin 60-75 của SEQ ID NO:3 (tương ứng với các gốc axit amin 118-133 của SEQ ID NO:1), hoặc trong các gốc axit amin 61-70 của SEQ ID NO:3 (tương ứng với các gốc axit amin 119-128 của SEQ ID NO:1). Đáp ứng đào thải đối với các kháng thể đã sử dụng có thể tránh được hoặc làm giảm bằng cách sử

dụng các đoạn kháng thể thiếu vùng hằng định có độ dài đầy đủ, như Fab. Trong một số phương pháp, cùng một kháng thể có thể có tác dụng vừa làm chất điều trị và vừa làm chất chẩn đoán.

Các chất chẩn đoán có thể được sử dụng bằng cách tiêm trong tĩnh mạch vào cơ thể của bệnh nhân, hoặc trực tiếp vào não bằng cách tiêm trong hộp sọ hoặc bằng cách khoan một lỗ qua hộp sọ. Liều của chất chẩn đoán nên nằm trong các khoảng giống như cho các phương pháp điều trị. Thông thường, chất chẩn đoán này được đánh dấu, mặc dù trong một số phương pháp, chất chẩn đoán chính có ái lực với tau không được đánh dấu và chất đánh dấu phụ được sử dụng để liên kết với chất chẩn đoán chính. Việc lựa chọn nhãn phụ thuộc vào cách thức phát hiện. Ví dụ, nhãn huỳnh quang là thích hợp để phát hiện bằng mắt thường. Việc sử dụng các nhãn thuận từ là thích hợp để phát hiện bằng cách chụp cắt lớp mà không cần can thiệp phẫu thuật. Các nhãn hoạt động phóng xạ cũng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng kỹ thuật chụp positron cắt lớp (PET) hoặc kỹ thuật ghi hình cắt lớp vi tính bằng bức xạ photon đơn (SPECT).

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

Việc chẩn đoán có thể được thực hiện bằng cách so sánh số lượng, kích thước, và/hoặc cường độ của các locut được đánh dấu, với các trị số đường cơ sở tương ứng. Các trị số đường cơ sở này có thể thể hiện các mức nồng độ trung bình trong nhóm các cá thể không mắc bệnh. Các trị số đường cơ sở cũng có thể thể hiện nhiều mức nồng độ trước đó đã được xác định ở cùng một bệnh nhân. Ví dụ, các trị số đường cơ sở có thể

được xác định ở bệnh nhân trước khi bắt đầu điều trị bằng liệu pháp miễn dịch tau, và các trị số đo được sau đó được so sánh với các trị số đường cơ sở. Sự giảm các trị số so với đường cơ sở báo hiệu đáp ứng tích cực với điều trị.

Ở một số bệnh nhân, việc chẩn đoán bệnh do protein tau có thể được hỗ trợ bằng cách thực hiện kỹ thuật quét PET. Kỹ thuật quét PET có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, thiết bị chụp ảnh PET thông thường và thiết bị hỗ trợ. Kỹ thuật quét thường bao gồm một hoặc nhiều vùng của não nói chung đã được biết là liên quan đến các lắng đọng protein tau và một hoặc nhiều vùng trong đó rất ít các lắng đọng, nếu có, thường có mặt để đóng vai trò làm đối chứng.

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

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

Các phối tử PET thích hợp bao gồm các kháng thể được đánh dấu phóng xạ theo sáng chế (ví dụ, kháng thể 16G7 của chuột, được làm tương thích với người, khảm hoặc được nguy trang). Các chất đồng vị phóng xạ được sử dụng có thể là, ví dụ, C^{11} , N^{13} , O^{15} , F^{18} , hoặc I^{123} . Khoảng cách giữa việc sử dụng phối tử PET và việc thực hiện kỹ thuật quét này có thể phụ thuộc vào phối tử PET và cụ thể là tốc độ hấp thu và đào thải của nó vào não, và thời gian bán thải của nhãn phóng xạ.

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

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

phòng bệnh và liệu pháp miễn dịch hướng tới tau (ví dụ, ít nhất 5, 10, 15 hoặc 20 năm, hoặc trong suốt cuộc đời còn lại của bệnh nhân).

Các mức lắng đọng protein tau bình thường có thể được xác định bằng lượng đám rối thần kinh hoặc thể vùi tau trong não của mẫu đại diện của các cá thể trong nhóm bình thường mà chưa được chẩn đoán mắc bệnh do protein tau cụ thể (ví dụ, bệnh Alzheimer) và không được xem là có nguy cơ phát triển bệnh này tăng (ví dụ, mẫu đại diện của các cá thể không mắc bệnh dưới 50 tuổi). Ngoài ra, mức bình thường có thể được nhận biết ở bệnh nhân đơn lẻ nếu tín hiệu PET theo các phương pháp này trong một vùng của não trong đó các lắng đọng protein tau được biết là có phát triển không khác biệt (trong khoảng chính xác của phép đo) với tín hiệu từ một vùng của não trong đó được biết là các lắng đọng này bình thường không phát triển. Mức gia tăng ở cá thể có thể được nhận biết bằng cách so sánh với các mức bình thường (ví dụ, giá trị trung bình cao nhất và phương sai của độ lệch chuẩn) hoặc đơn giản từ tín hiệu tăng vượt quá sai số thử nghiệm trong một vùng của não liên quan đến các lắng đọng protein tau so với vùng không được biết là có liên quan đến các lắng đọng. Với mục đích so sánh các mức lắng đọng protein tau ở cá thể và nhóm, các lắng đọng protein tau tốt hơn, nên được xác định trong (các) vùng não giống nhau, các vùng này bao gồm ít nhất một vùng trong đó các lắng đọng protein tau liên quan đến bệnh do protein tau cụ thể (ví dụ, bệnh Alzheimer) được biết là tạo thành. Bệnh nhân có mức lắng đọng protein tau tăng là ứng viên cho liệu pháp miễn dịch khởi đầu.

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

Sự duy trì các lắng đọng protein tau ở mức gần như hằng định hoặc ngay cả sự tăng nhẹ các lắng đọng protein tau cũng có thể là dấu hiệu về sự đáp ứng với điều trị dù là đáp ứng dưới mức tối ưu. Các đáp ứng này có thể được so sánh với sự thay đổi theo

thời gian của các mức lắng đọng protein tau ở bệnh nhân mắc bệnh do protein tau cụ thể (ví dụ, bệnh Alzheimer) mà không nhận được điều trị, để xác định liệu pháp miễn dịch này có tác dụng trong việc ức chế sự tăng thêm các lắng đọng protein tau hay không.

Việc theo dõi các thay đổi ở các lắng đọng protein tau cho phép điều chỉnh liệu pháp miễn dịch hoặc phác đồ điều trị khác đáp ứng với việc điều trị này. Việc theo dõi bằng PET cung cấp chỉ báo về bản chất và mức độ của đáp ứng với việc điều trị. Sau đó việc xác định có thể được thực hiện để điều chỉnh việc điều trị hoặc không và nếu muốn, việc điều trị có thể được điều chỉnh đáp ứng với việc theo dõi bằng PET. Do đó việc theo dõi bằng PET cho phép liệu pháp miễn dịch hướng tới tau hoặc phác đồ điều trị khác được điều chỉnh trước khi các chất đánh dấu sinh học khác, MRI hoặc các biện pháp theo kinh nghiệm phản hồi theo cách phát hiện được. Thay đổi đáng kể có nghĩa là việc so sánh trị số của một tham số sau khi điều trị so với nền cung cấp một số bằng chứng cho thấy việc điều trị có hoặc không gây ra tác dụng có lợi. Trong một số trường hợp, sự thay đổi các trị số của một tham số ở chính bệnh nhân cung cấp bằng chứng cho thấy việc điều trị có hoặc không gây ra tác dụng có lợi. Trong các trường hợp khác, sự thay đổi của các trị số, nếu có, ở bệnh nhân, được so sánh với sự thay đổi của các trị số, nếu có, ở nhóm bệnh nhân đối chứng đại diện không trải qua liệu pháp miễn dịch. Sự khác biệt về đáp ứng ở một bệnh nhân cụ thể so với đáp ứng bình thường ở bệnh nhân đối chứng (ví dụ, trị số trung bình cộng phương sai của độ lệch chuẩn) cũng có thể cung cấp bằng chứng là phác đồ liệu pháp miễn dịch này đang đạt được hoặc không đạt được tác dụng có lợi ở bệnh nhân.

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

Nếu việc theo dõi chỉ ra các mức lắng đọng protein tau ở bệnh nhân đã được làm giảm đến các mức lắng đọng protein tau bình thường hoặc gần như bình thường, phác đồ liệu pháp miễn dịch có thể được điều chỉnh từ liều cảm ứng (nghĩa là, làm giảm các mức lắng đọng protein tau) đến liều duy trì (nghĩa là, duy trì các lắng đọng protein tau ở mức

gần như hằng định). Phác đồ này có thể được tác động bằng cách làm giảm liều và hoặc tần số sử dụng liệu pháp miễn dịch.

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

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

Phần mô tả trên đây về việc chẩn đoán, theo dõi và điều chỉnh việc điều trị các bệnh bị gây ra bởi protein tau được tập trung chủ yếu vào việc sử dụng kỹ thuật quét PET. Tuy nhiên, kỹ thuật khác bất kỳ để quan sát và/hoặc đo các lắng đọng protein tau mà thích hợp cho việc sử dụng các kháng thể tau theo sáng chế (ví dụ, kháng thể 16G7 của chuột, được làm tương thích với người, khám hoặc được ngụ trang) có thể được sử dụng thay cho kỹ thuật quét PET để thực hiện các phương pháp này.

Cũng được đề xuất là các phương pháp phát hiện đáp ứng miễn dịch kháng tau ở bệnh nhân mắc bệnh hoặc dễ nhiễm bệnh liên quan đến tau. Các phương pháp này có thể được sử dụng để theo dõi quá trình điều trị phòng ngừa và chữa bệnh bằng các chất được đề xuất ở đây. Protein kháng thể sau khi gây miễn dịch thụ động thường thể hiện đỉnh tức thời của nồng độ kháng thể sau đó giảm theo hàm số mũ. Nếu không có liều bổ sung, sự

suy giảm này đạt tới mức nồng độ trước điều trị trong khoảng vài ngày đến vài tháng tùy theo thời gian bán thải của kháng thể được sử dụng. Ví dụ, thời gian bán thải của một số kháng thể của người là khoảng 20 ngày.

Trong một số phương pháp, phép đo đường cơ sở của kháng thể với tau ở đối tượng này được thực hiện trước khi sử dụng, phép đo thứ hai được thực hiện ngay sau đó để xác định mức nồng độ kháng thể đỉnh, và một hoặc nhiều phép đo khác được thực hiện giãn cách 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 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 nhóm bao gồm các đối tượng được lợi từ phương pháp điều trị) việc sử dụng một liều kháng thể bổ sung được chỉ định.

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

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

Kit

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

Tờ hướng dẫn sử dụng đề cập đến hướng dẫn thường nằm trong các gói thương mại của dược phẩm mà chứa thông tin về các chỉ định, cách sử dụng, liều, đường sử

dụng, chống chỉ định và/hoặc các khuyến cáo liên quan đến việc sử dụng các dược phẩm này.

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

Các ứng dụng khác

Các kháng thể có thể được sử dụng để phát hiện tau hoặc các đoạn của nó, trong trường hợp chẩn đoán hoặc điều trị lâm sàng hoặc trong nghiên cứu. Ví dụ, các kháng thể này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của tau trong mẫu sinh học như là dấu hiệu chỉ ra rằng mẫu sinh học này chứa lắng đọng tau. Sự 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 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 tránh sự biến đổi ngẫu nhiên không phụ thuộc vào các sự khác biệt giữa các mẫu này. Sau đó so sánh trực tiếp có thể được thực hiện giữa (các) mẫu sinh học và (các) mẫu đối chứng này để xác định sự liên kết của kháng thể (*nghĩa là*, sự có mặt của tau) với (các) mẫu sinh học được gia tăng, giảm đi hay giữ nguyên so với sự liên kết của kháng thể với (các) mẫu đối chứng. Sự liên kết của kháng thể với (các) mẫu sinh học tăng lên so với (các) mẫu đối chứng chỉ ra sự có mặt của tau trong (các) mẫu sinh học này. Trong một số trường hợp, sự liên kết của kháng thể tăng 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 sự liên kết của kháng thể này với mẫu đối chứng.

Ngoài ra, các kháng thể này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của tau trong mẫu sinh học để theo dõi và đánh giá hiệu quả của dược chất đang được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương

não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP). Mẫu sinh học từ bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) được đánh giá để xây dựng đường cơ sở cho sự liên kết của kháng thể với mẫu này (*nghĩa là*, đường cơ sở về sự có mặt của tau trong mẫu này) trước khi bắt đầu liệu pháp với dược chất. Trong một số trường hợp, nhiều mẫu sinh học của bệnh nhân được đánh giá tại nhiều thời điểm để xây dựng cả đường cơ sở và đo biến đổi ngẫu nhiên không phụ thuộc vào điều trị. Sau đó một dược chất được sử dụng theo phác đồ. Phác đồ này có thể bao gồm nhiều lần sử dụng dược chất này trong một khoảng thời gian. Tùy ý, sự liên kết của các kháng thể (*nghĩa là*, sự có mặt của tau) được đánh giá vào nhiều thời điểm trong nhiều mẫu sinh học của bệnh nhân, để xây dựng phép đo biến đổi ngẫu nhiên và thể hiện xu hướng đáp ứng với liệu pháp miễn dịch. Sau đó nhiều đánh giá khác nhau về khả năng liên kết của kháng thể với mẫu sinh học được so sánh. Nếu chỉ có hai đánh giá được thực hiện, việc so sánh trực tiếp có thể được thực hiện giữa hai đánh giá này để xác định sự liên kết của kháng thể (*nghĩa là*, sự có mặt của tau) đã tăng, giảm hay giữ nguyên giữa hai đánh giá này. Nếu nhiều hơn hai phép đo được thực hiện, các phép đo này có thể được phân tích theo dòng thời gian bắt đầu từ trước khi điều trị bằng dược chất và tiếp tục xuyên suốt thời gian điều trị. Ở các bệnh nhân mà sự liên kết kháng thể với mẫu sinh học giảm (*nghĩa là*, sự có mặt của tau), có thể kết luận là dược chất là hiệu quả trong việc điều trị bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-

Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt u hạt, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) ở bệnh nhân. Sự giảm liên kết của kháng thể có thể có ý nghĩa thống kê. Tùy ý, sự 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 sự liên kết kháng thể có thể được thực hiện kết hợp với việc đánh giá các dấu hiệu và triệu chứng khác của bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, bệnh Parkinson postencephalitic, chứng sa sút trí tuệ sau chấn thương hoặc sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh Pick, bệnh Niemann-Pick typ C, bệnh liệt trên nhân, bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh hạt u hạt, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP).

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

Tất cả các patent lưu trữ, các website, các công bố khác, các số truy cập và các tài liệu tương tự được trích dẫn trên đây hoặc dưới đây được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả các mục đích ở mức độ giống như thể từng tài liệu này được chỉ ra cụ thể và riêng biệt để được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Nếu nhiều dạng khác nhau của một trình tự đi kèm theo một số truy cập ở nhiều thời điểm khác nhau, dạng đi kèm theo số truy cập này tại ngày nộp đơn hiệu lực được dự định. Ngày nộp đơn hiệu lực nghĩa là ngày trước ngày nộp đơn thực sự hoặc ngày nộp đơn ưu tiên viện dẫn đến số truy cập này nếu áp dụng được. Tương tự, nếu nhiều bản khác nhau của một công bố, website hoặc

tương tự được công bố ở nhiều thời điểm khác nhau, bản được công bố gần nhất vào ngày nộp đơn hiệu lực của đơn này được dự định, trừ khi có quy định khác. Dấu hiệu, bước, yếu tố, phương án hoặc khía cạnh bất kỳ của sáng chế có thể được sử dụng kết hợp với dấu hiệu, bước, yếu tố, phương án hoặc khía cạnh bất kỳ khác, trừ khi có quy định khác. Mặc dù sáng chế đã được mô tả chi tiết bằng cách minh họa và lấy ví dụ nhằm mục đích rõ ràng và dễ hiểu, rõ ràng là một số thay đổi và cải biến có thể được thực hiện trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

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

Kháng thể đơn dòng 16G7 được tạo ra theo một phương pháp cải biến của phương pháp của Kohler và Milstein (G. Kohler và C. Milstein (1975) Nature 256:495-497). Tau người chứa cả 4 đoạn lặp liên kết vi ống, và thiếu các biến thể cắt nối đầu cùng N (4R0N tau, 383 axit amin) được sử dụng trong tất cả các lần tiêm và các thử nghiệm sàng lọc. Tau được tinh chế từ các tế bào SF9 đã chuyển nhiễm với cấu trúc baculovirus chứa tau (J. Knops et al. (1991) J Cell Biol 115(5):725-33). Chuột A/J sáu tuần tuổi được tiêm bằng 100 µg tau đã tinh chế với thời gian giãn cách là hai tuần. Tau được nhũ hóa trong tá dược Freund hoàn chỉnh để gây miễn dịch lần thứ nhất và trong tá dược Freund không hoàn chỉnh cho các lần gây miễn dịch tiếp theo. Các mẫu huyết thanh được lấy ba ngày sau khi tiêm lần thứ ba để đánh giá hiệu giá của các động vật này. Chuột có hiệu giá cao nhất được tiêm trong tĩnh mạch bằng 100 µg tau trong 500 µL PBS hai tuần sau khi được tiêm lần thứ ba. Sự dung hợp tế bào u tủy xảy ra ba ngày sau đó bằng cách sử dụng SP2/0 làm đối tác dung hợp. Dịch nổi từ các giếng chứa các tế bào lai được sàng lọc về khả năng kết tủa tau được đánh dấu ¹²⁵I của chúng. Tau được iot hóa phóng xạ bằng cách sử dụng glucoza oxidaza và lactoperoxidaza được bất động theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Bio-Rad). Nói ngắn gọn, 10 µg tau tái tổ hợp đã tinh chế được đánh dấu phóng xạ bằng 1 mCi Na¹²⁵I đến hoạt tính đặc hiệu là 20 µCi/µg protein. 16G7 được xác định là kháng thể đơn dòng ái lực cao đặc hiệu với tau và được tách dòng bằng cách pha loãng giới hạn. Isotyp của 16G7 được xác định là gamma 1 kapa.

Ví dụ 2. Lập bản đồ epitop của kháng thể 16G7

Khoảng các peptit được biotin hóa gộp lên nhau kéo dài toàn bộ protein tau người 383aa 4R0N được sử dụng để lập bản đồ kháng thể 16G7 chuột. Các peptit bổ sung được

sử dụng để tạo mô hình các biến đổi sau dịch mã tiềm năng của các đầu cùng C và N của protein này.

Các peptit được biotin hóa được liên kết với các giếng riêng biệt của đĩa ELISA phủ streptavidin. Đĩa này được phong bế và được xử lý bằng 16G7 chuột, sau đó ủ với kháng thể kháng chuột được liên hợp với peroxidaza cây cải ngựa. Sau khi rửa kỹ, OPD được phủ lên đĩa này và được để cho phát triển. Đĩa được đọc ở độ hấp thụ 450nm. Việc trừ nền được thực hiện với các trị số độ hấp thụ từ các giếng không chứa kháng thể sơ cấp, và ngưỡng đối với liên kết dương được đặt bằng 0,2 đơn vị hấp thụ.

Liên kết dương được phát hiện cho các gốc axit amin kéo dài peptit 55-69 của SEQ ID NO:3, với sự liên kết ít hơn được phát hiện đối với các gốc axit amin kéo dài peptit 64-78 của SEQ ID NO:3 (Fig.1). Bằng cách sử dụng cách đánh số protein tau người 4R2N có độ dài đầy đủ (441 axit amin) (SEQ ID NO:1) các peptit này lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 113-127 và 122-136 của SEQ ID NO:1.

Ví dụ 3. Thiết kế các kháng thể 16G7 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu hoặc kháng thể cho để làm tương thích với người là kháng thể chuột 16G7. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của m16G7 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:7. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của m16G7 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:11. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 tổ hợp Kabat/Chothia chuỗi nặng được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:8-10. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 Kabat chuỗi nhẹ được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO:12-14. Cách đánh số Kabat được sử dụng trong toàn bộ phần này.

Kappa biến đổi (Vk) của 16G7 thuộc phân nhóm 1 Kabat chuột mà tương ứng với phân nhóm 4 Kabat người và chuỗi nặng biến đổi (Vh) thuộc phân nhóm 2b Kabat chuột mà tương ứng với phân nhóm 1 Kabat người [Kabat E.A., et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. Công bố NIH số 91-3242]. CDR-L1 Chothia 17 gốc thuộc lớp chính tắc 3, CDR-L2 Chothia 7 gốc thuộc lớp 1, CDR-L3 Chothia 9 gốc thuộc lớp 1 trong Vk [Martin A.C, and Thornton J.M. (1996) J. Mol. Biol. 263:800-15.]. CDR-H1 Chothia 10 gốc thuộc lớp 1, CDR-H2 Chothia 17 gốc thuộc lớp 2 [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H3 không có lớp chính tắc, nhưng vòng 9 gốc này có thể có bazơ xoắn theo các nguyên tắc của Shirai et al [Shirai H, et al., (1999) FEBS Lett. 455:188-97.]. Nghiên cứu được thực hiện trên các trình tự protein trong cơ sở dữ liệu

PDB (Deshpande N và đồng tác giả, (2005) *Nucleic Acids Res.* 33: D233-7.] để tìm ra các cấu trúc sẽ cung cấp mô hình cấu trúc thô của 16G7. Cấu trúc của kháng nguyên kháng O của FAB vi khuẩn *Francisella tularensis* (mã pdb 3UJT) [Rynkiewicz, M.J., et al., (2012) *Biochemistry* 51: 5684-5694] với độ phân giải là 2.1A được sử dụng để xây dựng mô hình Fv của 16G7. Nó giữ lại cấu trúc chính tắc cho các vòng này giống như 16G7. Đối với VLv1, VLv2, và VLv3, các trình tự nhận VL người AAB24404.1 và AEK69364.1 từ nghiên cứu cơ sở dữ liệu trình tự protein không dư thừa từ NCBI cũng được sử dụng (theo nguyên tắc tương thích với người INN trước đây). Đối với VHv1, VHv2, VHv3, VHv4, VHv5V và VHv5VR, các trình tự nhận nhận AAA18265.1 và ADW08092.1 từ một nghiên cứu về cơ sở dữ liệu trình tự protein không dư thừa từ NCBI cũng được sử dụng (theo nguyên tắc làm tương thích với người INN trước đây).

Theo nguyên tắc làm tương thích kháng thể với người INN 2015 [Jones, T.D., et al, (2016), *The INNs and outs of antibody nonproprietary names.* *mAbs* (<http://dx.doi.org/10.1080/19420862.2015.1114320>)], nghiên cứu cơ sở dữ liệu IMGT cho phép lựa chọn các khung dòng mầm của người thích hợp mà các CDR chuột được ghép vào đó. Với Vk, chuỗi nhẹ kapa người với IMGT#IGKV4-1*01 được chọn. Chuỗi này có cùng các lớp chính tắc cho CDR-L1, CDR-L2 và L3, và thuộc phân nhóm 1 kapa người. Với Vh, chuỗi nặng người với IMGT#IGHV1-2*02 được chọn, thuộc phân nhóm 1 chuỗi nặng của người. Nó có chung dạng chính tắc của 16G7 CDR-H1 và H2. VHv2a, VHv2b, VHv2aB7, VHv2bH7, VHv6a, VHv6b và VHv7 được thiết kế bằng cách sử dụng IMGT#IGHV1-2*02 làm trình tự nhận.

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 INN WHO. (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>) Các gốc được thay đổi để bắt cặp với trình tự dòng mầm của người tương ứng, nếu có thể, để làm tăng tính chất người.

13 biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và 3 biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa các hoán vị

khác nhau của các đột biến thể (hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b, hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR, hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b, và hu16G7VHv7, (SEQ ID NO: 15-27, tương ứng) và hu16G7VLv1, hu16G7VLv2, và hu16G7VLv3 (SEQ ID NOS:28-30, tương ứng) (Bảng 4 và 3). Các thiết kế Vh và Vk 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 3 và 4, tương ứng. Các vùng được tô màu xám trong Bảng 3 và 4 thể hiện các CDR như được xác định bởi Tổ hợp Kabat/Chothia. SEQ ID NO: 15-27 và SEQ ID NO: 28-30 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong Bảng 5. Các axit amin ở các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H31, H37, H38, H40, H48, H60, H64, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82s, H82b, H83, và H85 trong hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b, hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR, hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b, và hu16G7VHv7 được liệt kê trong Bảng 6. Các axit amin ở các vị trí trong L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, và L48 hu16G7VLv1, hu16G7VLv2, và hu16G7VLv3 được liệt kê trong bảng 7. Tỷ lệ phần trăm tính chất người đối với các chuỗi VH được làm tương thích với người hu16G7VHv1, hu16G7VHv2, hu16G7VHv2a, 16G7VHv2aB7, hu16G7VHv2b, hu16G7VHv2bH7, hu16G7VHv3, hu16G7VHv4, hu16G7VHv5V, hu16G7VHv5VR, hu16G7VHv6a, hu16G7VHv6b, và hu16G7VHv7, (SEQ ID NO: 15-27, tương ứng) và các chuỗi VL được làm tương thích với người hu16G7VLv1, hu16G7VLv2, và hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:28-30, tương ứng) được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 3

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VL chuỗi (SEQ ID NO:11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMG1GKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)
1	1	Fr1	D	D	D	D	D

Bảng 3

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VL chuột (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)
2	2	Fr1	I	I	I	I	I
3	3	Fr1	V	V	V	V	V
4	4	Fr1	L	M	L	L	L
5	5	Fr1	S	T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	P	P	P	P	P
9	9	Fr1	S	D	S	S	S
10	10	Fr1	S	S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L	L	L	L
12	12	Fr1	A	A	A	A	A
13	13	Fr1	V	V	V	V	V
14	14	Fr1	S	S	S	S	S
15	15	Fr1	V	L	V	V	V
16	16	Fr1	G	G	G	G	G
17	17	Fr1	E	E	E	E	E
18	18	Fr1	K	R	K	R	K
19	19	Fr1	V	A	V	A	V
20	20	Fr1	T	T	T	T	T
21	21	Fr1	M	I	M	I	M
22	22	Fr1	S	N	S	S	S
23	23	Fr1	C	C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	V	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	L	L	L	L

Bảng 3

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	I6G7 VL chuỗi (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)
27D	31	CDR-L1	D	Y	D	D	D
27E	32	CDR-L1	G	S	G	G	G
27F	33	CDR-L1	N	S	N	N	N
28	34	CDR-L1	D	N	D	D	D
29	35	CDR-L1	Q	N	Q	Q	Q
30	36	CDR-L1	K	K	K	K	K
31	37	CDR-L1	N	N	N	N	N
32	38	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y
33	39	CDR-L1	L	L	L	L	L
34	40	CDR-L1	A	A	A	A	A
35	41	Fr2	W	W	W	W	W
36	42	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
37	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
38	44	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
39	45	Fr2	K	K	K	K	K
40	46	Fr2	P	P	P	P	P
41	47	Fr2	G	G	G	G	G
42	48	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q
43	49	Fr2	S	P	S	S	S
44	50	Fr2	P	P	P	P	P
45	51	Fr2	K	K	K	K	K
46	52	Fr2	L	L	L	L	L
47	53	Fr2	L	L	L	L	L
48	54	Fr2	M	I	M	I	I
49	55	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y
50	56	CDR-L2	W	W	W	W	W
51	57	CDR-L2	A	A	A	A	A
52	58	CDR-L2	S	S	S	S	S
53	59	CDR-L2	T	T	T	T	T

Bảng 3

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VL chuột (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMG1#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)
54	60	CDR-L2	R	R	R	R	R
55	61	CDR-L2	E	E	E	E	E
56	62	CDR-L2	S	S	S	S	S
57	63	Fr3	G	G	G	G	G
58	64	Fr3	V	V	V	V	V
59	65	Fr3	P	P	P	P	P
60	66	Fr3	D	D	D	D	D
61	67	Fr3	R	R	R	R	R
62	68	Fr3	F	F	F	F	F
63	69	Fr3	T	S	S	S	S
64	70	Fr3	G	G	G	G	G
65	71	Fr3	S	S	S	S	S
66	72	Fr3	G	G	G	G	G
67	73	Fr3	S	S	S	S	S
68	74	Fr3	G	G	G	G	G
69	75	Fr3	T	T	T	T	T
70	76	Fr3	D	D	D	D	D
71	77	Fr3	F	F	F	F	F
72	78	Fr3	T	T	T	T	T
73	79	Fr3	L	L	L	L	L
74	80	Fr3	T	T	T	T	T
75	81	Fr3	I	I	I	I	I
76	82	Fr3	S	S	S	S	S
77	83	Fr3	S	S	S	S	S
78	84	Fr3	L	L	L	L	L
79	85	Fr3	K	Q	Q	Q	Q
80	86	Fr3	A	A	A	A	A
81	87	Fr3	E	E	E	E	E
82	88	Fr3	D	D	D	D	D

Bảng 3

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VL chuỗi (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)
83	89	Fr3	L	V	V	V	V
84	90	Fr3	A	A	A	A	A
85	91	Fr3	V	V	V	V	V
86	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
87	93	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y
88	94	Fr3	C	C	C	C	C
89	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
90	96	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q
91	97	CDR-L3	F	Y	F	F	F
92	98	CDR-L3	Y	Y	Y	Y	Y
93	99	CDR-L3	D	S	D	D	D
94	100	CDR-L3	Y	T	Y	Y	Y
95	101	CDR-L3	P	P	P	P	P
95A		CDR-L3					
95B		CDR-L3					
95C		CDR-L3					
95D		CDR-L3					
95E		CDR-L3					
95F		CDR-L3					
96	102	CDR-L3	W		W	W	W
97	103	CDR-L3	T		T	T	T
98	104	Fr4	F		F	F	F
99	105	Fr4	G		G	G	G
100	106	Fr4	G		G	G	G
101	107	Fr4	G		G	G	G
102	108	Fr4	T		T	T	T
103	109	Fr4	K		K	K	K
104	110	Fr4	L		L	L	L
105	111	Fr4	E		E	E	E

Bảng 3

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VL chuỗi (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGTT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)
106	112	Fr4	I		I	I	I
106A	113	Fr4	K		K	K	K
107	114	Fr4	R		R	R	R

Bảng 4

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMG1#	IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)
1	1	Fr1	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	Q	Q	E
2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V	Q	Q	V	V	V	V	Q	Q	Q	Q	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	P	S	P	S	S	S	S	S	P	S	P	P	P	S	P	P
8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	S	A	S	A	A	A	A	A	S	A	S	S	A	A	A	A
10	10	Fr1	V	E	V	E	E	E	E	E	V	E	V	V	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V	L	L	V	V	V	V	L	L	L	L	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	K	K	K
13	13	Fr1	R	K	R	K	K	K	K	K	R	K	R	R	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	18	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
20	20	Fr1	L	V	L	L	V	V	V	V	L	L	L	L	V	V	V	V
21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	Fr1	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	Fr1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

Bảng 4

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGTF#	IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)
28	28	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
29	29	Fr1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
30	30	Fr1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
31	31	CDR-H1	S	G	S	S	S	S	G	S	G	S	S	S	S	S	S	S
32	32	CDR-H1	S	Y	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
33	33	CDR-H1	W	Y	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
34	34	CDR-H1	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
35	35	CDR-H1	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
35A		CDR-H1																
35B		CDR-H1																
36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	A	V	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	K	R	K	R	R	R	R	R	R	R	R	K	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A	R	A	R	R	R	R	R	A	A	R	R	A	A	A
41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
44	44	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	M	M	M
49	49	Fr2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	E	W	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	CDR-H2	Y	N	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
52A	53	CDR-H2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P

Bảng 4

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGIT#	IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)
52B																		
52C																		
53	54	CDR-H2N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
54	55	CDR-H2S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
55	56	CDR-H2G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
56	57	CDR-H2N	N	G	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
57	58	CDR-H2T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
59	60	CDR-H2Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2N	N	A	N	N	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N	N
61	62	CDR-H2E	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
62	63	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
63	64	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
64	65	Fr3	K	Q	K	K	K	K	K	Q	K	K	K	K	K	K	K	K
65	66	Fr3	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R	K	R	K	K	R	R	R	K	K	K	R	R	R	R
67	68	Fr3	A	V	A	V	A	A	V	V	V	A	A	A	V	V	V	V
68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	L	M	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	M	M	M	M
70	71	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	V	R	V	V	V	V	R	R	V	V	V	V	V	V	V	V
72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	I	T	I	T	I	I	I	I	T	I	I	I	I	T	I	I
74	75	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	I	S	A	I	I	I	I	A	S	S	S	I	I	I	I
76	77	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
78	79	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A

Bảng 4

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMG T#	IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)
79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	V	M	V	M	M	M	M	M	M	M	M	V	V	M	M	M
81	82	Fr3	D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
82	83	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
82A	84	Fr3	T	S	T	T	S	S	S	S	S	T	T	T	T	S	S	S
82B	85	Fr3	S	R	S	S	R	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	87	Fr3	T	R	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	R	R	R
84	88	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	D	E	E	D	D	D	D	D	E	E	E	E	D	D	D
86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	S	T	S	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	97	Fr3	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
94	98	CDR-H3	R		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
95	99	CDR-H3	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
96	100	CDR-H3	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
97	101	CDR-H3	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
98	102	CDR-H3	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
99	103	CDR-H3	I		I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
100	104	CDR-H3	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
100A	105		L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
100B																		
100C																		

Bảng 4

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	16G7 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMG#	IGHV1-2*02 (SEQ ID NO: 33)	hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)
100D																		
100E																		
100F																		
100G																		
100H																		
100I																		
100J																		
100K																		
101	106	CDR-H3	D			D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
102	107	CDR-H3	Y			Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
103	108	Fr4	W			W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	109	Fr4	G			G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	110	Fr4	Q			Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	111	Fr4	G			G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	112	Fr4	T			T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	113	Fr4	T			T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
109	114	Fr4	L			V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
110	115	Fr4	I			T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	116	Fr4	V			V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	117	Fr4	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	118	Fr4	S			S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Bảng 5: Đột biến ngược V_H , V_L và các đột biến khác cho 16G7 được làm tương thích với người

Bảng 5

Biến thể V _H hoặc V _L	Trình tự nhận exon V _H hoặc V _L	Các thay đổi từ các gốc khung trình tự nhận và các gốc CDR (dựa vào các CDR Tổ hợp Kabat/Chothia)
hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H37, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H75, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H83
16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H12, H31, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73, H83
hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H12, H40, H48, H69, H73, H83
hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H12, H31, H40, H48, H60, H64, H69, H73, H83
hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H75, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H5, H11, H12, H20, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82A, H82B, H83, H85
hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33)	H7, H71, H73

Bảng 5

Biến thể V _H hoặc V _L	Trình tự nhận exon V _H hoặc V _L	Các thay đổi từ các gốc khung trình tự nhận và các gốc CDR (dựa vào các CDR Tổ hợp Kabat/Chothia)
hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H71
hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-2*02 (SEQ (ID NO: 33))	H1, H7, H71, H73
Hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	Mã truy cập NCBI IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43, L48
Hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	Mã truy cập NCBI IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36))	L4, L9, L15, L22, L43
Hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)	Mã truy cập NCBI IMGT#IGKV4-1*01 (SEQ ID NO:36)	L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, L43

Bảng 6: Đánh số Kabat các gốc khung (hoặc CDR) (dựa vào các CDR Tổ hợp Kabat/Chothia) cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong chuỗi nặng của kháng thể 16G7 được làm tương thích với người

Bảng 6

Gốc	(Chuỗi nặng)	16G7 chuỗi	hu16G7VHv1	hu16G7VHv2	hu16G7VHv2a	16G7VHv2aB7	hu16G7VHv2b	hu16G7VHv2bH7	hu16G7VHv3	hu16G7VHv4	hu16G7VHv5V	hu16G7VHv5VR	hu16G7VHv6a	hu16G7VHv6b	hu16G7VHv7
H1	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	Q	Q	E
H5	V	Q	Q	Q	V	V	V	V	Q	Q	Q	Q	V	V	V
H7	S	P	P	S	S	S	S	S	P	S	P	P	P	S	P
H9	A	S	S	A	A	A	A	A	S	A	S	S	A	A	A
H10	E	V	V	E	E	E	E	E	V	E	V	V	E	E	E
H11	V	L	L	L	V	V	V	V	L	L	L	L	V	V	V
H12	K	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	K	K	K
H13	K	R	R	K	K	K	K	K	R	K	R	R	K	K	K
H20	V	L	L	L	V	V	V	V	L	L	L	L	V	V	V
H31	G	S	S	S	S	G	S	G	S	S	S	S	S	S	S
H37	V	A	A	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
H38	R	K	K	R	R	R	R	R	R	R	K	R	R	R	R
H40	A	R	R	A	R	R	R	R	A	A	R	R	A	A	A
H48	M	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	M	M	M

Bảng 6

Gốc	(Chuỗi nặng)	16G7 chuột	Hu16G7VHv1	Hu16G7VHv2	Hu16G7VHv2a	16G7VHv2aB7	Hu16G7VHv2b	Hu16G7VHv2bH7	Hu16G7VHv3	Hu16G7VHv4	Hu16G7VHv5V	Hu16G7VHv5VR	Hu16G7VHv6a	Hu16G7VHv6b	Hu16G7VHv7
H60	A	N	N	N	N	A	N	A	N	N	N	N	N	N	N
H64	Q	K	K	K	K	K	K	Q	K	K	K	K	K	K	K
H66	R	K	K	R	K	K	R	R	R	K	K	K	R	R	R
H67	V	A	A	V	A	A	V	V	V	A	A	A	V	V	V
H69	M	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	M	M	M
H71	R	V	V	V	V	V	R	R	V	V	V	V	V	V	V
H73	T	I	I	T	I	I	I	I	T	I	I	I	I	T	I
H75	I	S	S	A	I	I	I	I	A	S	S	S	I	I	I
H80	M	V	V	M	M	M	M	M	M	M	V	V	M	M	M
H82A	S	T	T	T	S	S	S	S	T	T	T	T	S	S	S
H82B	R	S	S	S	R	R	R	R	S	S	S	S	R	R	R
H83	R	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	R	R	R
H85	D	E	E	E	D	D	D	D	E	E	E	E	D	D	D

Bảng 7: 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 16G7 được làm tương thích với người

Gốc	IMGT#IGKV4-1*01 (Chuỗi nhẹ)	16G7 chuột	Hu16G7VLv1	Hu16G7VLv2	Hu16G7VLv3
L4	M	L	L	L	L
L9	D	S	S	S	S
L15	L	V	V	V	V
L18	R	K	K	R	K
L19	A	V	V	A	V
L21	I	M	M	I	M
L22	N	S	S	S	S
L43	P	S	S	S	S
L48	I	M	M	I	I

Bảng 8: Tỷ lệ phần trăm tính chất người của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể 16G7 được làm tương thích với người

Biến thể V _H hoặc V _L	% Tính chất người
hu16G7VHv1 (SEQ ID NO:15)	64,30%
hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16)	76,50%
hu16G7VHv2a (SEQ ID NO:17)	79,60%
16G7VHv2aB7 (SEQ ID NO:18)	81,60%
hu16G7VHv2b (SEQ ID NO:19)	82,70%
hu16G7VHv2bH7 (SEQ ID NO: 20)	85,70%
hu16G7VHv3 (SEQ ID NO:21)	72,40%
hu16G7VHv4 (SEQ ID NO:22)	73,50%
hu16G7VHv5V (SEQ ID NO:23)	66,30%
hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO:24)	67,30%
hu16G7VHv6a (SEQ ID NO:25)	86,70%
hu16G7VHv6b (SEQ ID NO:26)	88,80%
hu16G7VHv7 (SEQ ID NO:27)	85,70%
hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28)	82,20%
hu16G7VLv2 (SEQ ID NO:29)	86,10%
hu16G7VLv3 (SEQ ID NO:30)	83,20%

Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc, gốc được ngưng trang, hoặc gốc ở mặt phân cách khác nhau giữa các trình tự nhận của chuột và người là các ứng viên cho sự thế. Các ví dụ về các gốc chính tắc/tương tác CDR bao gồm các gốc Kabat H24, H26, H27, H29, H34, H52a, H55, H70, H71, H74, H94, L2, L4, L25, L27b, L33, L48, L64, L71, L90, và L95 trong Bảng 4. Ví dụ về các gốc ở mặt phân cách/đóng gói (VH+VL) bao gồm các gốc Kabat H35, H37, H39, H45, H47, H91, H93, H95, H100a, H103, L34, L36, L38, L44, L46, L87, L89, L91, L96, L98, trong Bảng 3.

Lý do để lựa chọn các vị trí được chỉ ra trong Bảng 3 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ làm ứng viên cho sự thế là như sau.

M4L là đột biến của gốc tiếp xúc với LCDR1 và LCDR3 P43S là đột biến của gốc tiếp xúc với hai gốc ở mặt phân cách trong (Y91 và W103) trong VH. I48M là đột biến của gốc ở mặt phân cách. D9S, L15V, R18K, A19V, I21M, và N22S là các đột biến ngược dựa trên tần số hoặc các đột biến bắt cặp tần số/dòng mầm.

Lý do để lựa chọn các vị trí được chỉ ra trong Bảng 4 trong vùng biến đổi chuỗi nặng làm ứng viên cho sự thể là như sau.

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

S7P là đột biến thành prolin để cải thiện sự gấp. R71V là đột biến của góc mà có thể tiếp xúc với HCDR2 qua liên kết hydro. T73I là đột biến của góc mà có thể tiếp xúc với HCDR1 và HCDR2.

V5Q, E10V, V11L, K12V, K13R, V20L, S31G, V37A, R38K, A40R, M48I, N60A, K64Q, R66K, V67A, M69L, I75S, I75A, M80V, S82a-T, R83b-S, R83T, và D85E là các đột biến ngược dựa trên tần số hoặc đột biến bắt cặp dòng mầm.

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 thiết kế dựa trên các khung người này là:

KAPA BIẾN ĐỔI

hu16G7VLv1 (SEQ ID NO:28):

DIVLTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSP
KLLMYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTF
GGGTKLEIKR

hu16G7VLv2 (SEQ ID NO: 29):

DIVLTQSPSSLAIVSVGERATISCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQ

KPGQSPKLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQ
QFYDYPWTFGGGTKLEIKR

hu16G7VLv3 (SEQ ID NO: 30):

DIVLTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSP
KLLIYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFG
GGGTKLEIKR

CHUỖI NẶNG BIẾN ĐỔI

hu16G7VHv1 (SEQ ID NO: 15):

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWAKQRPGQGLEWIGE
IYPNSGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDTAVYYCARLGWLIPL
DYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv2 (SEQ ID NO:16):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIG
EIYPNSGNTNYNEKFKGRVTLTVDTASTAYMELTSLTSEDTAVYYCARLGWLIPL
LDYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv2a (SEQ ID NO: 17):

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGLEWIG
EIYPNSGNTNYNEKFKGKATLTVDISISTAYMELSRSLTSDDTAVYYCARLGWLIP
LDYWGQGTTVTVSS

hu16G7VH2aB7 (SEQ ID NO: 18)

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTGSWIHWVRQRPQGLEWIG
EIYPNSGNTNYAEKFKGKATLTVDISISTAYMELSRSLTSDDTAVYYCARLGWLIP
LDYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv2b (SEQ ID NO: 19):

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGLEWIG
EIYPNSGNTNYNEKFKGRVTLTRDISISTAYMELSRSLTSDDTAVYYCARLGWLIPL
DYWGQGTTVTVSS

hu16G7VH2bH7 (SEQ ID NO: 20)

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTGSWIHWVRQRPQGLEWIG
EIYPNSGNTNYAEKFGQGRVTLTRDISISTAYMELSRSLTSDDTAVYYCARLGWLIPL
DYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv3(SEQ ID NO: 21):

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGE
IYPNSGNTNYNEKFKGRVTLTVDTSASTAYMELTSLTSEDNAVYYCARLGWLIPL
DYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv4 (SEQ ID NO: 22):

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIG
EIYPNSGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYMELTSLTSEDNAVYYCARLGWLIP
LDYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv5V (SEQ ID NO: 23):

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVKQRPQGLEWIGE
IYPNSGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDNAVYYCARLGWLIPL
DYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv5VR (SEQ ID NO: 24):

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGLEWIGE
IYPNSGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDNAVYYCARLGWLIPL
DYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv6a (SEQ ID NO: 25):

QVQLVQPGAQEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWM
GEIYPNSGNTNYNEKFKGRVTMTVDISISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARLGWLI
PLDYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv6b (SEQ ID NO: 26):

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWM
GEIYPNSGNTNYNEKFKGRVTMTVDTSISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARLGWL
IPLDYWGQGTTVTVSS

hu16G7VHv7 (SEQ ID NO: 27):

EVQLVQPGAQEVKKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWM
GEIYPNSGNTNYNEKFKGRVTMTVDISISTAYMELSRRLRSDDTAVYYCARLGWLI
PLDYWGQGTTVTVSS

Ví dụ 4. 16G7 bắt giữ miễn dịch tau từ mô người mắc bệnh Alzheimer

Phương pháp:

Fig.4A: Mô vỏ não thái dương từ não bị bệnh Alzheimer được sử dụng để tách các phân đoạn protein có độ tan thay đổi. Mô đông lạnh được đồng nhất trong 5 thể tích đệm hợp nhất (RAB) (MES 100 mM, EGTA 1 mM, MgSO₄ 0,5mM, NaCl 750 mM, độ pH=6,8), và được ly tâm để tạo ra phân đoạn hòa tan-RAB. Sau đó pelet được đồng nhất trong 5 thể tích đệm thử nghiệm kết tủa miễn dịch phóng xạ (RIPA) (Tris 25 mM, NaCl 150 mM, NP-401%, natri deoxycholat 1%, SDS 0,1%, độ pH=7,5) và được ly tâm để tạo ra phân đoạn hòa tan-RIPA. Pelet này được đồng nhất trong 5 thể tích đệm sarkosyl (Tris 25 mM, EGTA 1 mM, sarkosyl 1%, sucroza 10%, DTT 1mM, NaCl 500 mM, độ pH=7,5), và được ly tâm để tạo ra phân đoạn hòa tan sarkosyl. Pelet không tan-sarkosyl cuối cùng này được đồng nhất trong SDS 2%. Các mẫu được tạo ra trong đệm mẫu khử/biến tính, và được dung giải bởi SDS-PAGE. Phân tích thâm tách Tây được thực hiện bằng cách sử dụng 16G7 chuột.

Fig.4B: Các phân đoạn protein hòa tan RAB được bào chế đến 1 mg/ml. Đối với mỗi kết tủa miễn dịch, 300 µg mẫu được sử dụng. 10µg kháng thể được chỉ định (đối chứng isotyp, 16G7, hoặc kháng thể kháng tau 16B5) được bổ sung vào các chế phẩm mẫu RAB, và được ủ trong 2 giờ. Sau đó các hạt từ protein G được bổ sung vào các hỗn hợp này, và được ủ thêm một giờ nữa để bắt giữ phức hợp kháng thể/kháng nguyên. Các mẫu được rửa kỹ bằng 1xPBS, và các hạt được luộc trong đệm mẫu khử/biến tính để giải phóng các protein bị bắt giữ. Các mẫu thu được được dung giải bởi SDS-PAGE và phân tích thâm tách Tây được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng kháng tau (Dako, #A0024).

Kết quả:

Fig.4A: 16G7 nhận biết tau hòa tan và không hòa tan-sarkosyl từ mô người bị bệnh Alzheimer. Các phân đoạn protein có độ tan khác nhau được dung giải bằng SDS-PAGE và được thâm hút với 16G7. Nhiều đồng dạng tau được thấy trong phân đoạn hòa tan và không hòa tan, và sự dịch chuyển độ linh động điện di được phát hiện trong các phân đoạn không hòa tan, phù hợp với dạng bệnh lý của tau. Có sự tích lũy đáng chú ý của tau trong phân đoạn không hòa tan sarkosyl. Trái: Chất đánh dấu khối lượng phân tử. Ký hiệu làn: 1-hòa tan RAB, 2-hòa tan RIPA, 3-hòa tan Sarkosyl, 4-không hòa tan Sarkosyl.

Fig.4B: 16G7 kết tủa miễn dịch tau từ mô bị bệnh Alzheimer. Các phân đoạn hòa tan-RAB được kết tủa miễn dịch với kháng thể đã chỉ định, và được phát hiện bằng kháng thể đa dòng kháng tau hướng tới vùng riêng của phân tử tau từ các vị trí liên kết đối với 16G7 và kháng thể kháng tau 16B5. 16G7 bắt giữ mạnh tau từ phân đoạn này. Đầu vào (mẫu hòa tan-RAB) được thể hiện ở bên phải.

Ví dụ 5. Khả năng phản ứng với mô người mắc bệnh Alzheimer (Hóa học mô miễn dịch)

Vỏ não trán thái dương thu được từ bệnh nhân không mắc bệnh thoái hóa thần kinh hoặc bệnh Alzheimer, được xác nhận nhờ đánh giá bằng xét nghiệm tử thi. Hóa học mô miễn dịch được thực hiện trên lát cắt đông lạnh được gắn trên phiến kính 10 μ m, được cố định nhẹ nhàng bằng axeton. Tất cả các bước nhuộm được thực hiện bằng cách sử dụng máy nhuộm tự động Leica BOND Rx, sử dụng vật tư tiêu hao Leica. Dạng chuột hoặc người của 16G7 được ủ với các lát cắt mô sau đó bổ sung các kháng thể thứ cấp phù hợp loài được liên hợp với polyme HRP. Để tránh liên kết không đặc hiệu của globulin miễn dịch nội sinh khi sử dụng các kháng thể được làm tương thích với người trên mô người, các kháng thể này được đánh dấu không đồng hóa trị bằng đoạn Fab hóa trị một kháng người được liên hợp biotin trên in vitro trước khi ủ trên mô. Mô được đánh dấu bằng phức hợp kháng thể sơ cấp-đoạn Fab biotin được khuếch đại thêm bằng cách sử dụng hệ khuếch đại avidin-biotin (Vector Laboratories, Burlingame, CA). Sự bắt màu được quan sát với chất tạo màu DAB, tạo ra sự bắt màu nâu. Đối chứng âm bao gồm thực hiện toàn bộ quy trình hóa học mô miễn dịch trên các lát cắt liên kề với kháng thể đối chứng isotyp IgG.

Các kháng thể được kiểm tra là 16G7 chuột, 16G7 khảm (chứa VH và VL từ kháng thể chuột với các vùng hằng định người, chuỗi nặng SEQ ID NO:54 và chuỗi nhẹ SEQ ID NO:55), và các biến thể 16G7 được làm tương thích với người hu16G7VHv7/hu16G7VLv2 và hu16G7VHv2bH7/hu16G7VLv2.

Việc nhuộm được thực hiện với 16G7 chuột, 16G7 khảm, và các dạng được làm tương thích với người của 16G7 (hu16G7VHv7/hu16G7VLv2 và hu16G7VHv2bH7/hu16G7VLv2) được so sánh định lượng và được đánh giá về độ đậm và cường độ của sự bắt màu, cũng như định vị phản ứng miễn dịch. Cường độ của sự bắt màu là tương tự đối với các dạng khảm và được làm tương thích với người của 16G7, và

thể hiện các mẫu định vị tương tự so với dạng chuột của kháng thể này. Tau được phát hiện trong các đám rối thần kinh, sợi, sợi mạng thần kinh, và trong các sợi trục thoái hóa. Cũng có sự bắt màu soma đáng chú ý được phát hiện.

Ví dụ 6. Hoạt tính phân ly

Phương pháp:

Kết tụ tau tái tổ hợp - Tau tái tổ hợp đã tinh chế với đuôi 6xHis đầu cùng N được kết hợp với lượng đẳng mol của heparin khối lượng phân tử thấp trong 1xPBS (độ pH=7,4), và được ủ ở 37°C trong 96 giờ trên máy tạo chuyển động lắc lư. Sự kết tụ của mẫu được xác nhận bằng cách liên kết với Thioflavin T.

Ủ với các kháng thể - các kháng thể được ủ với tau tái tổ hợp, đã kết tụ ở các tỉ lệ mol đã chỉ định được ủ ở 37°C trong 96 giờ mà không quay tròn hoặc lắc lư. Ở thời điểm kết thúc thử nghiệm, sự kết tụ được đo bằng cách ủ các mẫu với Thioflavin T 25 mM, và đo huỳnh quang phát ra (450nm/482nm kích thích/phát). Các tín hiệu được trừ nền cho các mẫu đệm.

Kết quả:

Như được thể hiện trong Fig.5, 16G7 tốt hơn, nếu phân tách các sợi tau không hoạt động. Tỉ lệ mol thay đổi của 16G7 (hình tam giác), đối chứng isotyp (hình vòng tròn) và kháng thể kháng tau 16B5 (hình vuông) được ủ với các sợi tau chứa tinh bột trong 96 giờ. Tại thời điểm kết thúc giai đoạn này, mức độ kết tụ được đánh giá bằng sự liên kết với thioflavin T. 16G7 ưu tiên làm giảm tín hiệu thioflavin T có mặt trong mẫu này, so với cả kháng thể đối chứng isotyp cũng như kháng thể kháng tau 16B5 mà liên kết với vùng khác của tau.

Ví dụ 7. Ái lực của kháng thể 16G7 chuột với tau

Phân tích SPR được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 để xác định động học liên kết của 16G7 với tau người tái tổ hợp. Để chuẩn bị bề mặt cảm biến, kháng thể kháng chuột (GE Life Sciences) được bất động trên chip cảm biến CM5 nhờ tạo cặp amin, và 16G7 bị bắt giữ ở mức đảm bảo sự liên kết tối đa là 50 RU. Nhiều nồng độ khác nhau của tau tái tổ hợp nằm trong khoảng từ 10-0,14 nM được đi qua phối tử đã bị bắt giữ ở tốc độ dòng là 50 μ L/phút trong đệm chạy (HBS + 0,05% P-20, 1 mg/mL BSA), để kết hợp 180 giây và phân ly 900 giây. Dữ liệu được tham chiếu hai lần đến cả bộ cảm

biến không liên quan không chứa phối tử kháng thể, và nồng độ chất điện phân 0 nM để tính toán sự phân ly của phối tử từ gốc bắt giữ. Sau đó dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng mô hình chính hợp chung 1:1. Động học liên kết được chỉ ra trong Fig.6

Ví dụ 8. Ái lực của kháng thể khảm 16G7 và các biến thể được làm tương thích với người đối với tau

Phân tích SPR được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 để xác định động học liên kết của 16G7 với tau người tái tổ hợp. Để chuẩn bị bề mặt cảm biến, kháng thể kháng người (GE Life Sciences) được bất động trên chip cảm biến CM5 bằng cách tạo cặp amin, và các kháng thể khảm hoặc được làm tương thích với người bị bắt giữ ở mức đảm bảo sự liên kết tối đa là 50 RU. Nhiều nồng độ khác nhau của tau tái tổ hợp nằm trong khoảng từ 10-0,14 nM được đi qua phối tử đã bị bắt giữ theo hướng song song ở tốc độ dòng là 50 μ L/phút trong đệm chạy (HBS + P-20 0,05%, BSA 1 mg/mL), để kết hợp 180 giây và phân ly 900 giây. Dữ liệu được tham chiếu hai lần đến cả bộ cảm biến không liên quan không chứa phối tử kháng thể, và nồng độ chất điện phân 0 nM để tính toán sự phân ly của phối tử từ gốc bắt giữ. Sau đó dữ liệu được phân tích bằng cách sử dụng mô hình chính hợp chung 1:1.

Các kháng thể được thử nghiệm là 16G7 khảm ((chứa VH và VL từ kháng thể chuột với các vùng hằng định của người, chuỗi nặng SEQ ID NO:54 và chuỗi nhẹ SEQ ID NO:55), và các biến thể được làm tương thích với người (hu16G7VHv2a/hu16G7VLv2, hu16G7VHv2b/hu16G7VLv2, và hu16G7VHv7/hu16G7VLv2),

Fig.7: Ái lực của các kháng thể được thử nghiệm được xác định bằng phân tích SPR. Các nồng độ khác nhau của tau tái tổ hợp được chảy qua kháng thể đã được bất động, và đồ thị cảm biến thu được được phân tích bằng cách sử dụng mô hình chính hợp chung 1:1. Ái lực động học, tốc độ liên hợp, và phân ly được thể hiện trong Fig.7.

Ví dụ 9. Ái lực với tau kết tụ

Phương pháp:

Tạo ra các đoạn Fab-các đoạn Fab của 16G7 được tạo ra bằng cách sử dụng kit Fab Micro Preparation theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Pierce). Việc loại bỏ Fc được giải phóng và kiểm tra sản phẩm cuối cùng không hoạt động được theo dõi bằng SDS-

PAGE, và nồng độ được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm axit bicinchoninic (Pierce).

Sự kết tụ của tau tái tổ hợp - Tau tái tổ hợp đã tinh chế với đuôi 6xHis đầu cùng N được kết hợp với lượng đẳng mol của heparin khối lượng phân tử thấp trong 1xPBS (độ pH=7,4), và được ủ ở 37°C trong 96 giờ trên máy tạo chuyển động lắc lư. Sự kết tụ của mẫu được xác nhận bằng cách liên kết với Thioflavin T.

Phân tích SPR của các đoạn Fab và kháng thể nguyên vẹn - Các nghiên cứu so sánh liên kết của các đoạn Fab và các kháng thể nguyên vẹn được thực hiện bằng Biacore T200. Để chuẩn bị bề mặt cảm biến, các kháng thể kháng his (GE Life Sciences) được bất động trên chip cảm biến CM3 nhờ tạo cặp amin, và tau tái tổ hợp đã kết tụ (được bào chế trên đây) được cho qua kênh thử nghiệm và đóng vai trò là phối tử của thử nghiệm. 16G7 (kháng thể nguyên vẹn hoặc các đoạn Fab) được đi qua tau kết tụ đã bị bắt giữ ở tốc độ dòng là 50 μ L/phút trong đệm chạy (HBS + P-20 0,05%, BSA 1 mg/mL) ở chế độ chu kỳ đơn, ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 10-0,016nM cho các pha kết hợp 180 giây và pha phân ly cuối cùng là 900 giây. Các vết kết hợp/phân ly được trừ tham chiếu hai lần cho cả cảm biến không liên quan không chứa phối tử kháng thể, và nồng độ chất điện phân 0 nM để tính toán sự phân ly của phối tử từ góc bắt giữ.

Kết quả:

Ái lực (avidity) là số đo của nhiều ái lực (affinity) của tương tác kháng thể-kháng nguyên, và thể hiện gần hơn ái lực chức năng của kháng thể đối với kháng nguyên đã bị bất động như khối kết tụ hoặc đám rối thần kinh chứa tau. Trong các phép đo SPR, sự khác biệt giữa ái lực (affinity) (tương tác đơn) và ái lực (avidity) (nhiều tương tác) được tạo ra bằng cách so sánh động học liên kết của đoạn Fab chứa một vùng liên kết duy nhất, và kháng thể nguyên vẹn với hai vùng liên kết.

Trong Fig.8, các số đo về khả năng liên kết của các đoạn 16G7 Fab được so sánh với kháng thể nguyên vẹn. Pha liên hợp (các hàng ngang nét liền) và phân ly (hàng ngang nét chấm vạch) được lập biểu đồ. Sự khác biệt giữa ái lực (affinity) một vị trí liên kết và ái lực (avidity) hai vị trí liên kết là rõ ràng nhất trong pha phân ly cuối cùng, bắt đầu ở 1300 giây. Có sự phân ly không rõ ràng của phức hợp kháng thể/kháng nguyên đối với kháng thể nguyên vẹn, trong khi đó các đoạn Fab phân ly rõ ràng từ tau kết tụ.

Danh mục trình tự

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHT EIP EGTTAEEAGI
GDTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP G
QKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP
PTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKIGSTENLKHQP GGG
KVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNI
HHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENA
KAKTDHGAEIVYKSPVVSGD TSPRHLSNVSS TGSIDMVDSPQLATLADEV SASLA
KQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGT
GSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPK
SGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAP
VPM PDLKNVSKIGSTENLKHQP GGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVP
GGGSVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIG
SLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGD TSPRHLSN
VSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

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

MAEPRQEFVEMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEAGIGD
TPSLEDEAAGHV TQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPP GQK
GQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT
REP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPM PDLKNVSKIGSTENLKHQP GGGK
VQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIH
HKPGGGQVEVKSEKLD FKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHK LTFRENAK
AKTDHGAEIVYKSPVVSGD TSPRHLSNVSS TGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAK
QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTAEEAGI
 GDTPSLEDEAAGHVVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPG
 QKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTP
 PTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKIGSTENLKHQPGGG
 KVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLD
 NITHVPGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSS
 TGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKESPLQTPT
 EDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAE EAGIGDTPSLEDEAAGHVVTQARMVSKSKDGT
 GSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPK
 SGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPTREP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAP
 VPMPLKKNVSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHK
 GGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKT
 DHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSS TGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFEVMEHDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGD TDAGLKAEEAGIGD
 TPSLEDEAAGHVVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQK
 GQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPT
 REP KKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPLKKNVSKIGSTENLKHQPGGGK
 VQIVYKPV DLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDKDRVQSKIGSLDNI
 THVPGGGNKKIETHKLTFR ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSRHL SNVSS TGS
 SIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

SEQ ID NO:7; trình tự protein VH:

QVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWAKQRPGQGLEWIGEIYPN
 SGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYVDLTSLTSEDSAVYYCARLGWLIPLDYW
 GQGTTLIVSS

SEQ ID NO:8; HCDR1 chuột:

GYTFTSSWIH

SEQ ID NO:9; HCDR2 chuột:

EIYPNSGNTNYNEKFKG

SEQ ID NO:10; HCDR3 chuột:

LGWLIPLDY

SEQ ID NO:11; Trình tự protein VL chuột:

DIVLSQSPSSLAVSVGEKVTMSCSSQSLLDGNDQKNYLA WYQQKPGQSPKLLM
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLKAEDLAVYYCQQFYDYPWTFGGGT
KLEIKR

SEQ ID NO:12; LCDR1 chuột:

KSSQSLLDGNDQKNYLA

SEQ ID NO:13; LCDR2 chuột:

WASTRES

SEQ ID NO:14; LCDR3 chuột:

QQFYDYPWT

SEQ ID NO:15; >hu16G7VHv1

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWAKQRPQGGLIEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:16; > hu16G7VHv2

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPQGGLIEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGRVTLTVDTSASTAYMELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:17; > hu16G7VHv2a

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGGLIEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGKATLTVDISISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:18; > hu16G7VHv2aB7

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTGSWIHWVRQRPGQGLEWIGEIYPN
SGNTNYAEKFKGKATLTVDISISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:19; > hu16G7VHv2b

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPGQGLEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGRVTLTRDISISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:20; > hu16G7VHv2bH7

EVQLVQSGAEVVKPGASVKVSCKASGYTFTGSWIHWVRQRPGQGLEWIGEIYPN
SGNTNYAEKFKGRVTLTRDISISTAYMELSRLLTSDDTAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:21; > hu16G7VHv3

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGRVTLTVDTSASTAYMELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 22; > hu16G7VHv4

EVQLQQSGAELVKPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYMELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:23; > hu16G7VHv5V

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVKQRPGQGLEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:24; > hu16G7VHv5VR

EVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPGQGLEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYVELTSLTSEDVAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 25; > hu16G7VHv6a

QVQLVQPGAENVKKPGASVKVSCASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWMGEIYP
NSGNTNYNEKFKGRVTMTVDISISTAYMELSRLSDDTAVYYCARLGWLIPLDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:26; > hu16G7VHv6b

QVQLVQSGAENVKKPGASVKVSCASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWMGEIYP
NSGNTNYNEKFKGRVTMTVDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYCARLGWLIPLDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:27; > hu16G7VHv7

EVQLVQPGAENVKKPGASVKVSCASGYTFTSSWIHWVRQAPGQGLEWMGEIYP
NSGNTNYNEKFKGRVTMTVDISISTAYMELSRLSDDTAVYYCARLGWLIPLDY
WGQGTTVTVSS

SEQ ID NO: 28; > hu16G7VLv1

DIVLTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLL
MYWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGG
TKLEIKR

SEQ ID NO: 29; > hu16G7VLv2

DIVLTQSPSSLAIVSVGERATISCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLIY
WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGG
LEIKR

SEQ ID NO:30; > hu16G7VLv3

DIVLTQSPSSLAIVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLI
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGG
KLEIKR

SEQ ID NO: 31; Trình tự nhận người VH AAA18265.1

QVQLVQSGAENVKKPGASVKVSCASGYTFTDYMHWRQAPGRGLEWMGRIN
PNSGGTNYAQQFKGRVTMTRDTSIRTA YVELSR L T SDDTAVYYCASLADDDPED
FWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 32; Trình tự nhận người VH ADW08092.1

QVQLVESGAEVKKPGASVKLSCKASGYTFSSYWMHWVRQAPGQRLEWMGEIN
 PDNGHTNYNEKFKSRVTITVDKSASTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREADYSYGA
 FDIWGPGETTVTVSS

SEQ ID NO: 33; Trình tự nhận người VH IMGT# IGHV1-2*02

QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSKASGYTFTGYMHWVRQAPGQGLEWMGWI
 NPNSGGTNYAQKFQGRVTMTRDTSISTAYMELSRLSDDTAVYYC

SEQ ID NO: 34; Trình tự nhận người VL AAB24404.1

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSLLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
 WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTPPMFGQGTK
 VEIKR

SEQ ID NO:35; Trình tự nhận người VL AEK69364.1

DIVLTQSPDSLAVSLGERATIKCKSSQSVLYGSDSKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
 WASTRESGVPDRFSGSGSGTEFTLTISSLQAADVAVYYCQEYYSSLCTFGQGTKL
 EIKR

SEQ ID NO: 36; Trình tự nhận người VL IMGT#IGKV4-1*01

DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCKSSQSVLYSSNNKNYLAWYQQKPGQPPKLLIY
 WASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQYYSTP

SEQ ID NO:37; Trình tự nucleotit VH chuột:

CAGGTCCAACCTGCAGCAGCCTGGGTCTGTGCTGGTGAGGCCTGGAGCTTCAG
 TGAAGCTGTCCTGCAAGGCTTCTGGCTACACCTTCACCAGCTCCTGGATACAC
 TGGGCGAAGCAGAGGCCTGGACAAGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTATC
 CTAATAGTGGTAATACTAATACTACAATGAGAAGTTCAAGGGCAAGGCCACACT
 GACTGTAGACATATCCTCCAGCACAGCCTACGTGGATCTCACCAGCCTGACA
 TCTGAGGACTCTGCGGTCTATTATTGTGCAAGATTGGGATGGTTAATACCCCT
 TGACTACTGGGGCCAAGGCACCACTCTCATAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:38; Trình tự nucleotit VL chuột:

GACATTGTGCTGTCACAGTCTCCATCCTCCCTAGCTGTGTCAGTTGGAGAGAA
 GGTTACTATGAGCTGCAAGTCCAGTCAGAGCCTTTTAGATGGTAATGATCAA
 AAGAACTACTTGGCCTGGTACCAGCAGAAACCAGGGCAGTCTCCTAAACTGC

TGATGTACTGGGCATCCACTAGGGAATCTGGGGTCCCTGATCGCTTCACAGG
CAGTGGATCTGGGACAGATTTCACTCTCACCATCAGCAGTTTGAAGGCTGAA
GACCTGGCAGTTTATTACTGTCAGCAGTTTTATGACTATCCGTGGACGTTCCGG
TGGAGGCACCAAGCTGGAAATCAAACGT

SEQ ID NO:39; Kabat CDR-H1

SSWIH

SEQ ID NO:40; Chothia CDR-H1

GYTFTSS

SEQ ID NO:41; Chothia CDR-H2

YPNSGN

SEQ ID NO:42; AbM CDR-H2

EIYPNSGNTN

SEQ ID NO:43; Contact CDR-L1

KNYLAWY

SEQ ID NO:44; Contact CDR-L2

LLMYWASTRE

SEQ ID NO:45; Contact CDR-L3

QQFYDYPW

SEQ ID NO:46; Contact CDR-H1

TSSWIH

SEQ ID NO:47; Contact CDR-H2

WIGEIYPNSGNTN

SEQ ID NO:48; Contact CDR-H3

ARLGWLIPLD

SEQ ID NO: 49; CDR-H1 xen kē

GYTFTGSWIH

SEQ ID NO: 50; CDR-H2 xen kẽ

EIYPNSGNTNYAEKFKG

SEQ ID:51; CDR-H2 xen kẽ

EIYPNSGNTNYAEKFQG

SEQ ID NO:52; trình tự axit amin liên ứng trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 16G7 chuột và kháng thể 16G7 được làm tương thích với người (được đánh dấu “Chính” trong Fig.2).

EVQLXQXGAEXVKPGASVKXSCKASGYTFTSSWIHWVRQRPQGLEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGXXTLTVDISISTAYMELXXLTSXDTAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTVTVSS

SEQ ID NO:53; trình tự axit amin liên ứng trong số các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 chuột và kháng thể 16G7 được làm tương thích với người (được đánh dấu “Chính” trong Fig.3).

DIVLTQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLX
YWASTRESGVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQAEDVAVYYCQQFYDYPWTFGGGT
KLEIKR

SEQ ID NO: 54; chuỗi nặng của kháng thể 16G7 khảm

QVQLQQPGSVLVRPGASVKLSCKASGYTFTSSWIHWAKQRPGQGLEWIGEIYPN
SGNTNYNEKFKGKATLTVDISSSTAYVDLTSLSSEDSAVYYCARLGWLIPLDYW
GQGTTLIVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKEP
KSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV
KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSN
KALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVE
WESNGQPENNYKTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFCFSVMHEALH
NHYTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 55; chuỗi nhẹ của kháng thể 16G7 khảm

DIVLSQSPSSLAVSVGEKVTMSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQQKPGQSPKLLM
YWASTRESGVPDRFTGSGSGTDFTLTISSLKAEDLAVYYCQQFYDYPWTFGGGT

KLEIKRKTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS
GNSQESVTEQDSKDYSLSSSTLTLKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR
GEC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập, trong đó ba CDR chuỗi nặng như được xác định bởi tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9, và SEQ ID NO: 10) và ba CDR chuỗi nhẹ như được xác định bởi tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13, và SEQ ID NO: 14); với điều kiện là vị trí H31 bị chiếm bởi S hoặc G, vị trí H60 bị chiếm bởi N hoặc A và vị trí 64 bị chiếm bởi K hoặc Q.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 49.
3. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 50.
4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 51.
5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin SEQ ID NO:18 hoặc SEQ ID NO:20.
6. Phương pháp làm cho kháng thể chuột tương thích với người, phương pháp này bao gồm:
 - (a) chọn một hoặc nhiều kháng thể nhận;
 - (b) nhận diện 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 tạo ra kháng thể được làm tương thích với người;trong đó kháng thể chuột này được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự nêu trong SEQ ID NO:11.
7. Kháng thể đơn dòng được phân lập, trong đó kháng thể này chứa ba CDR chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO:7 và ba CDR chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 11.
8. Kháng thể theo điểm 7, trong đó ba CDR chuỗi nặng như được xác định bởi tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 8, SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10) và ba CDR chuỗi nhẹ

như được xác định bởi tổ hợp Kabat/Chothia (SEQ ID NO: 12, SEQ ID NO: 13 và SEQ ID NO: 14).

9. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này là kháng thể khảm, kháng thể được nguy trang hoặc kháng thể được làm tương thích với người.

10. Phương pháp tạo ra kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được nguy trang theo điểm 9, 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, để các tế bào này tiết ra kháng thể này; và

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

11. 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 theo điểm 9, 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.

12. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người.

13. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này là kháng thể nguyên vẹn.

14. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này là đoạn liên kết.

15. Kháng thể theo điểm 14, trong đó đoạn liên kết này là kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab, hoặc $F(ab')_2$.

16. Kháng thể theo điểm 7, trong đó isotyp này là IgG1 người.

17. Kháng thể theo điểm 7, trong đó isotyp là isotyp IgG2 hoặc IgG4 người.

18. Kháng thể theo điểm 7, trong đó kháng thể này được liên hợp với dược chất, chất gây độc tế bào, chất kìm tế bào, chất dinh dưỡng thần kinh, hoặc chất bảo vệ thần kinh.

19. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm 7 và chất mang dược dụng.

20. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể theo điểm 7, hoặc vector biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic hoặc tế bào chủ được biến nạp bằng vector biểu hiện.

21. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 7, trong đó các CDR này theo định nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact.

22. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 21, 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.

23. Kháng thể theo điểm 22, trong đó kháng thể này có ít nhất một đột biến trong vùng hằng định.

24. Kháng thể theo điểm 23, trong đó đột biến làm giảm sự cố định hoặc hoạt hóa bổ thể bởi vùng hằng định hoặc liên kết với thụ thể Fcγ so với vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người.

25. Kháng thể theo điểm 24, trong đó kháng thể này có đột biến ở một hoặc nhiều trong số các vị trí 241, 264, 265, 270, 296, 297, 318, 320, 322, 329 và 331 theo cách đánh số EU hoặc có alanin ở các vị trí 318, 320 và 322.

26. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 21, 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:39, SEQ ID NO:9, và SEQ ID NO:10 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: 12 đến SEQ ID NO: 14.

27. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 21, 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 bất kỳ một trong số SEQ ID NO:15 đến SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 21 đến SEQ ID NO: 27 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 SEQ ID NO: 28 đến SEQ ID NO: 30.

28. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 27, với điều kiện là các vị trí L4, L9, L15, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, S, và S.

29. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 27, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L4 bị chiếm bởi L, L9 bị chiếm bởi S, L15 bị chiếm bởi V, L18 bị chiếm bởi K, L19 bị chiếm bởi V, L21 bị chiếm bởi M, L22 bị chiếm bởi S, và L43 bị chiếm bởi S.

30. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 29, với điều kiện là các vị trí L4, L9, L15, L18, L19, L21, L22, và L43 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, S, V, K, V, M, S, và S.

31. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 27, trong đó kháng thể này 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 SEQ ID NO: 15 đến SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 21 đến SEQ ID NO: 27 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 SEQ ID NO: 28 đến SEQ ID NO: 30.

32. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 31, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 15 đến SEQ ID NO: 17, SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 21 đến SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 28 đến SEQ ID NO: 30.

33. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 32, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 27 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 29.

34. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 27, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi E, H5 bị chiếm bởi Q, H7 bị chiếm bởi P, H9 bị chiếm bởi S, H10 bị chiếm bởi V, H11 bị chiếm bởi L, H12 bị chiếm bởi V, H13 bị chiếm bởi R, H20 bị chiếm bởi L, H40 bị chiếm bởi R, H48 bị chiếm bởi I, H66 bị chiếm bởi K, H67 bị chiếm bởi A, H69 bị chiếm

bởi L, H71 bị chiếm bởi V, H73 bị chiếm bởi I, H75 bị chiếm bởi S, H80 bị chiếm bởi V, H82a bị chiếm bởi T, H82b bị chiếm bởi S, H83 bị chiếm bởi T, và H85 bị chiếm bởi E.

35. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi, E, Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E.

36. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, T, S, T, và E.

37. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, L, V, T, S, T, và E.

38. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H60, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, A, L, I, và T.

39. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T.

40. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, K, A, L, V, I, và T.

41. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T.

42. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H7, H71, và H73 trong vùng VH bị lần lượt chiếm bởi P, V, và I.

43. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là vị trí H60 trong vùng VH bị chiếm bởi A.

44. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 27, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H1 bị chiếm bởi Q hoặc E, H5 bị chiếm bởi V hoặc Q, H7 bị chiếm bởi S hoặc P, H9 bị chiếm bởi A hoặc S, H10 bị chiếm bởi E hoặc V, H11 bị chiếm bởi V hoặc L, H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H13 bị chiếm bởi K hoặc R, H20 bị chiếm bởi V hoặc L, H37 bị chiếm bởi V hoặc A, H38 bị chiếm bởi R hoặc K, H40 bị chiếm bởi A hoặc R, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H60 bị chiếm bởi A hoặc N, H64 bị chiếm bởi Q hoặc K, H66 bị chiếm bởi R hoặc K, H67 bị chiếm bởi V hoặc A, H69 bị chiếm bởi M hoặc L, H71 bị chiếm bởi R hoặc V, H73 bị chiếm bởi T hoặc I, H75 bị chiếm bởi I, S, hoặc A, H80 bị chiếm bởi M hoặc V, H82a bị chiếm bởi S hoặc T, H82b bị chiếm bởi R hoặc S, H83 bị chiếm bởi R hoặc T, và H85 bị chiếm bởi D hoặc E.

45. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H37, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, A, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E.

46. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H11, H12, H20, H48, H69, H71, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, L, V, A, T, S, T, và E.

47. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, K, A, L, V, I, và T.

48. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, A, K, A, L, V, I, và T.

49. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, V, R, I, L, I, và T.

50. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H60, H66, H67, H69, H71, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, V, R, I, A, K, A, L, V, I, và T.

51. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H7, H71 và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, P, V và I.

52. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H12, H40, H48, H60, H64, H69, H73, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi, E, V, R, I, A, Q, L, I, và T.

53. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H48, H69, H71, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, I, L, V, A, T, S, T, và E.

54. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H11, H12, H20, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH bị chiếm bởi E, Q, L, V, L, I, K, A, L, V, I, S, T, S, T, và E.

55. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H38, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73I, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E, Q, P, S, V, L, V, R, L, K, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E.

56. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H5, H7, H9, H10, H11, H12, H13, H20, H40, H48, H66, H67, H69, H71, H73, H75, H80, H82a, H82b, H83, và H85 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, P, S, V, L, V, R, L, R, I, K, A, L, V, I, S, V, T, S, T, và E.

57. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H7, H71, và H73 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi P, V, và I.

58. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là vị trí H71 trong vùng VH bị chiếm bởi V.

59. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H1, H7, H71, và H73 trong vùng VH bị chiếm bởi E, P, V, và I.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Prothena Biosciences Ltd.

Barbour, Robin

Dolan, Philip J.

Liu, Yue

<120> Kháng thể nhận biết Tau, dược phẩm chứa kháng thể này và phương pháp tạo ra kháng thể này

<130> 057450-497448

<150> US 62/330,800

<151> 02-05-2016

<160> 55

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 441

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 1

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1

5

10

15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20

25

30

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

35

40

45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser

50

55

60

Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val

65

70

75

80

Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu

85

90

95

Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro

	100		105		110										
Ser	Leu	Glu	Asp	Glu	Ala	Ala	Gly	His	Val	Thr	Gln	Ala	Arg	Met	Val
	115		120		125										
Ser	Lys	Ser	Lys	Asp	Gly	Thr	Gly	Ser	Asp	Asp	Lys	Lys	Ala	Lys	Gly
	130		135		140										
Ala	Asp	Gly	Lys	Thr	Lys	Ile	Ala	Thr	Pro	Arg	Gly	Ala	Ala	Pro	Pro
145			150		155		160								
Gly	Gln	Lys	Gly	Gln	Ala	Asn	Ala	Thr	Arg	Ile	Pro	Ala	Lys	Thr	Pro
			165		170		175								
Pro	Ala	Pro	Lys	Thr	Pro	Pro	Ser	Ser	Gly	Glu	Pro	Pro	Lys	Ser	Gly
	180		185		190										
Asp	Arg	Ser	Gly	Tyr	Ser	Ser	Pro	Gly	Ser	Pro	Gly	Thr	Pro	Gly	Ser
	195		200		205										
Arg	Ser	Arg	Thr	Pro	Ser	Leu	Pro	Thr	Pro	Pro	Thr	Arg	Glu	Pro	Lys
	210		215		220										
Lys	Val	Ala	Val	Val	Arg	Thr	Pro	Pro	Lys	Ser	Pro	Ser	Ser	Ala	Lys
225			230		235		240								
Ser	Arg	Leu	Gln	Thr	Ala	Pro	Val	Pro	Met	Pro	Asp	Leu	Lys	Asn	Val
			245		250		255								
Lys	Ser	Lys	Ile	Gly	Ser	Thr	Glu	Asn	Leu	Lys	His	Gln	Pro	Gly	Gly
	260		265		270										
Gly	Lys	Val	Gln	Ile	Ile	Asn	Lys	Lys	Leu	Asp	Leu	Ser	Asn	Val	Gln
	275		280		285										
Ser	Lys	Cys	Gly	Ser	Lys	Asp	Asn	Ile	Lys	His	Val	Pro	Gly	Gly	Gly
	290		295		300										
Ser	Val	Gln	Ile	Val	Tyr	Lys	Pro	Val	Asp	Leu	Ser	Lys	Val	Thr	Ser
305			310		315		320								
Lys	Cys	Gly	Ser	Leu	Gly	Asn	Ile	His	His	Lys	Pro	Gly	Gly	Gly	Gln
			325		330		335								
Val	Glu	Val	Lys	Ser	Glu	Lys	Leu	Asp	Phe	Lys	Asp	Arg	Val	Gln	Ser

340 345 350
 Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly Asn
 355 360 365
 Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala
 370 375 380
 Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser
 385 390 395 400
 Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser
 405 410 415
 Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val
 420 425 430
 Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 435 440
 <210> 2
 <211> 412
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 2
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly
 65 70 75 80
 Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala
 85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys
 100 105 110
 Ala Lys Gly Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala
 115 120 125
 Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala
 130 135 140
 Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro
 145 150 155 160
 Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr
 165 170 175
 Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg
 180 185 190
 Gly Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
 195 200 205
 Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
 210 215 220
 Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
 225 230 235 240
 Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
 245 250 255
 Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
 260 265 270
 Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
 275 280 285
 Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
 290 295 300
 Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
 305 310 315 320
 Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly
 325 330 335

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn
 340 345 350

Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro
 355 360 365

Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser
 370 375 380

Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala
 385 390 395 400

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

<210> 3

<211> 383

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 3

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

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

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

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

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

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

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

Ile Pro Ala Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly

115 120 125
Glu Pro Pro Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser
130 135 140
Pro Gly Thr Pro Gly Ser Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro
145 150 155 160
Pro Thr Arg Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys
165 170 175
Ser Pro Ser Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met
180 185 190
Pro Asp Leu Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu
195 200 205
Lys His Gln Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu
210 215 220
Asp Leu Ser Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys
225 230 235 240
His Val Pro Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp
245 250 255
Leu Ser Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His
260 265 270
Lys Pro Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe
275 280 285
Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His
290 295 300
Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe
305 310 315 320
Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr
325 330 335
Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn
340 345 350
Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala

355 360 365
 Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 370 375 380
 <210> 4
 <211> 410
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 4
 Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly
 1 5 10 15
 Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His
 20 25 30
 Gln Asp Gln Glu Gly Asp Thr Asp Ala Gly Leu Lys Glu Ser Pro Leu
 35 40 45
 Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser
 50 55 60
 Asp Ala Lys Ser Thr Pro Thr Ala Glu Asp Val Thr Ala Pro Leu Val
 65 70 75 80
 Asp Glu Gly Ala Pro Gly Lys Gln Ala Ala Ala Gln Pro His Thr Glu
 85 90 95
 Ile Pro Glu Gly Thr Thr Ala Glu Glu Ala Gly Ile Gly Asp Thr Pro
 100 105 110
 Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala Arg Met Val
 115 120 125
 Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys Ala Lys Gly
 130 135 140
 Ala Asp Gly Lys Thr Lys Ile Ala Thr Pro Arg Gly Ala Ala Pro Pro
 145 150 155 160
 Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala Lys Thr Pro
 165 170 175

Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro Lys Ser Gly
 180 185 190
 Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr Pro Gly Ser
 195 200 205
 Arg Ser Arg Thr Pro Ser Leu Pro Thr Pro Pro Thr Arg Glu Pro Lys
 210 215 220
 Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser Ser Ala Lys
 225 230 235 240
 Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu Lys Asn Val
 245 250 255
 Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln Pro Gly Gly
 260 265 270
 Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys Val Thr
 275 280 285
 Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly Gly Gly
 290 295 300
 Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg Val Gln
 305 310 315 320
 Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly Gly Gly
 325 330 335
 Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn Ala Lys
 340 345 350
 Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser Pro Val Val
 355 360 365
 Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser Thr Gly
 370 375 380
 Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu Ala Asp Glu
 385 390 395 400
 Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 405 410

<210> 5

<211> 381

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 5

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1 5 10 15

Thr Tyr Gly Leu Gly Asp Arg Lys Asp Gln Gly Gly Tyr Thr Met His

20 25 30

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

35 40 45

Gln Thr Pro Thr Glu Asp Gly Ser Glu Glu Pro Gly Ser Glu Thr Ser

50 55 60

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

65 70 75 80

Asp Thr Pro Ser Leu Glu Asp Glu Ala Ala Gly His Val Thr Gln Ala

85 90 95

Arg Met Val Ser Lys Ser Lys Asp Gly Thr Gly Ser Asp Asp Lys Lys

100 105 110

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

115 120 125

Ala Pro Pro Gly Gln Lys Gly Gln Ala Asn Ala Thr Arg Ile Pro Ala

130 135 140

Lys Thr Pro Pro Ala Pro Lys Thr Pro Pro Ser Ser Gly Glu Pro Pro

145 150 155 160

Lys Ser Gly Asp Arg Ser Gly Tyr Ser Ser Pro Gly Ser Pro Gly Thr

165 170 175

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

180 185 190

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser

195	200	205
Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu		
210	215	220
Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln		
225	230	235
Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser		
	245	250
Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro		
	260	270
Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp		
275	280	285
Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro		
290	295	300
Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu		
305	310	315
Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser		
	325	330
Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser		
	340	345
Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu		
355	360	365
Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu		
370	375	380

<210> 6

<211> 352

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 6

Met Ala Glu Pro Arg Gln Glu Phe Glu Val Met Glu Asp His Ala Gly

1

5

10

15

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

Phe Lys Asp Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr
 260 265 270
 His Val Pro Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr
 275 280 285
 Phe Arg Glu Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val
 290 295 300
 Tyr Lys Ser Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser
 305 310 315 320
 Asn Val Ser Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu
 325 330 335
 Ala Thr Leu Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
 340 345 350

 <210> 7
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 7

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

85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Leu Ile Val Ser Ser
 115

<210> 8

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 8

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 9

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 9

Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 10

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 10

Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr

1 5

<210> 11

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 11

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Gly

20 25 30

Asn Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Met Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Lys Ala Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Phe Tyr Asp Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 12

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Gly Asn Asp Gln Lys Asn Tyr Leu

1

5

10

15

Ala

<210> 13

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 13

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser

1

5

<210> 14

<211> 9

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 14

Gln Gln Phe Tyr Asp Tyr Pro Trp Thr

1

5

<210> 15

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 15

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

<210> 16

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 16

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

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 18

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Ser

 20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

 35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Glu Lys Phe

 50 55 60

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

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Thr Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

 85 90 95

Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 19

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

<210> 20

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 20

Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Ser
 20 25 30
Trp Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

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

<210> 21

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 21

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

Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 22

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 22

Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Val Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

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

Gly Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ser Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 23

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 23

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

1 5 10 15

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

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

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

65 70 75 80

Val Glu Leu Thr Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 24

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 24

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

1 5 10 15

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

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

<210> 25

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 25

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

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
 100 105 110
 Thr Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 26

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 26

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

<210> 27

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 27

Glu Val Gln Leu Val Gln Pro Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Met Thr Val Asp Ile Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Arg Leu Arg Ser Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 28

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 28

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

Lys Arg

<210> 29

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 29

Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Glu Arg Ala Thr Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Gly
 20 25 30
 Asn Asp Gln 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 Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

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

Lys Arg

<210> 30

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 30

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

Lys Arg

<210> 31

<211> 118

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 31

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

<210> 32

<211> 120

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 32

Gln Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30

Trp Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Arg Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Glu Ile Asn Pro Asp Asn Gly His Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe
 50 55 60

Lys Ser Arg Val Thr Ile Thr Val Asp Lys Ser Ala Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

Ala Arg Glu Ala Asp Tyr Ser Tyr Gly Ala Phe Asp Ile Trp Gly Pro
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 33

<211> 96

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 33

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
 1 5 10 15

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

Tyr Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met
 35 40 45

Gly Trp Ile Asn Pro Asn Ser Gly Gly Thr Asn Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

<210> 34

<211> 114

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 34

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Tyr Ser

20 25 30

Ser Asn Asn Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro Pro Met Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 35

<211> 114

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 35

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

1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Ile Lys Cys Lys Ser Ser Gln Ser Val Leu Tyr Gly

20 25 30

Ser Asp Ser Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Ala Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Glu
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Ser Leu Cys Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile
 100 105 110

Lys Arg

<210> 36

<211> 101

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 36

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
 50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr
 65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln
 85 90 95

Tyr Tyr Ser Thr Pro

100

<210> 37

<211> 354

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 37

caggtccaac tgcagcagcc tgggtctgtg ctggtgaggc ctggagcttc agtgaagctg 60
 tcctgcaagg cttctggcta caccttcacc agctcctgga tacactgggc gaagcagagg 120
 cctggacaag gccttgagtg gattggagag atttatccta atagtggtaa tactaactac 180
 aatgagaagt tcaagggcaa ggccacactg actgtagaca tatcctccag cacagcctac 240
 gtggatctca ccagcctgac atctgaggac tctgcggtct attattgtgc aagattggga 300
 tggttaatac cccttgacta ctggggccaa ggcaccactc tcatagtctc ctca 354

<210> 38

<211> 342

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 38

gacattgtgc tgtcacagtc tccatcctcc ctagctgtgt cagttggaga gaaggttact 60
 atgagctgca agtccagtca gaggcttita gatggtaatg atcaaaagaa ctacttggcc 120
 tggtagcagc agaaaccagg gcagtctcct aaactgctga tgtactgggc atccactagg 180
 gaatctgggg tccctgatcg cttcacaggc agtggatctg ggacagattt cactctcacc 240
 atcagcagtt tgaaggctga agacctggca gtttattact gtcagcagtt ttatgactat 300
 ccgtggacgt tcggtggagg caccaagctg gaaatcaaac gt 342

<210> 39

<211> 5

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 39

Ser Ser Trp Ile His

1 5

<210> 40

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 40

Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser

1 5

<210> 41

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 41

Tyr Pro Asn Ser Gly Asn

1 5

<210> 42

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 42

Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn

1 5 10

<210> 43

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 43

Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr

1 5

<210> 44

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 44

Leu Leu Met Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu

1 5 10

<210> 45

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 45

Gln Gln Phe Tyr Asp Tyr Pro Trp

1 5

<210> 46

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 46

Thr Ser Ser Trp Ile His

1 5

<210> 47

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 47

Trp Ile Gly Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn

1 5 10

<210> 48

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 48

Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp

1 5 10

<210> 49

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 49

Gly Tyr Thr Phe Thr Gly Ser Trp Ile His

1 5 10

<210> 50

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 50

Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Glu Lys Phe Lys

1 5 10 15

Gly

<210> 51

<211> 17

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 51

Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Ala Glu Lys Phe Gln

1 5 10 15

Gly

<210> 52

<211> 118

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (5)..(5)

<223> Xaa = Gln hoặc Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (7)..(7)

<223> Xaa = Pro hoặc Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (11)..(11)

<223> Xaa = Leu hoặc Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (20)..(20)

<223> Xaa = Leu hoặc Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (67)..(67)

<223> Xaa = Lys hoặc Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (68)..(68)

<223> Xaa = Ala hoặc Val

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (84)..(84)

<223> Xaa = Thr hoặc Ser

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (85)..(85)

<223> Xaa = Ser hoặc Arg

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (89)..(89)

<223> Xaa = Glu hoặc Asp

<400> 52

Glu Val Gln Leu Xaa Gln Xaa Gly Ala Glu Xaa Val Lys Pro Gly Ala

1 5 10 15

Ser Val Lys Xaa Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Ser

20 25 30

Trp Ile His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Glu Ile Tyr Pro Asn Ser Gly Asn Thr Asn Tyr Asn Glu Lys Phe

50 55 60

Lys Gly Xaa Xaa Thr Leu Thr Val Asp Ile Ser Ile Ser Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Xaa Xaa Leu Thr Ser Xaa Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Leu Gly Trp Leu Ile Pro Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Thr Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 53

<211> 114

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<220>

<221> MISC_FEATURE

<222> (54)..(54)

<223> Xaa = Met hoặc Ile

<400> 53

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

1 5 10 15

Glu Lys Val Thr Met Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Gly

20 25 30

Asn Asp Gln Lys Asn Tyr Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln

35 40 45

Ser Pro Lys Leu Leu Xaa Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val

50 55 60

Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr

65 70 75 80

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln

85 90 95

Phe Tyr Asp Tyr Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile

100 105 110

Lys Arg

<210> 54

<211> 448

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 54

Gln Val Gln Leu Gln Gln Pro Gly Ser Val Leu Val Arg Pro Gly Ala

1 5 10 15

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

20 25 30

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

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
 275 280 285
 Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
 290 295 300
 Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
 305 310 315 320
 Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
 325 330 335
 Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
 340 345 350
 Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
 355 360 365
 Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
 370 375 380
 Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
 385 390 395 400
 Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
 405 410 415
 Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
 420 425 430
 Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
 435 440 445
 <210> 55
 <211> 221
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo
 <220>
 <223> Được tổng hợp
 <400> 55
 Asp Ile Val Leu Ser Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ala Val Ser Val Gly

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

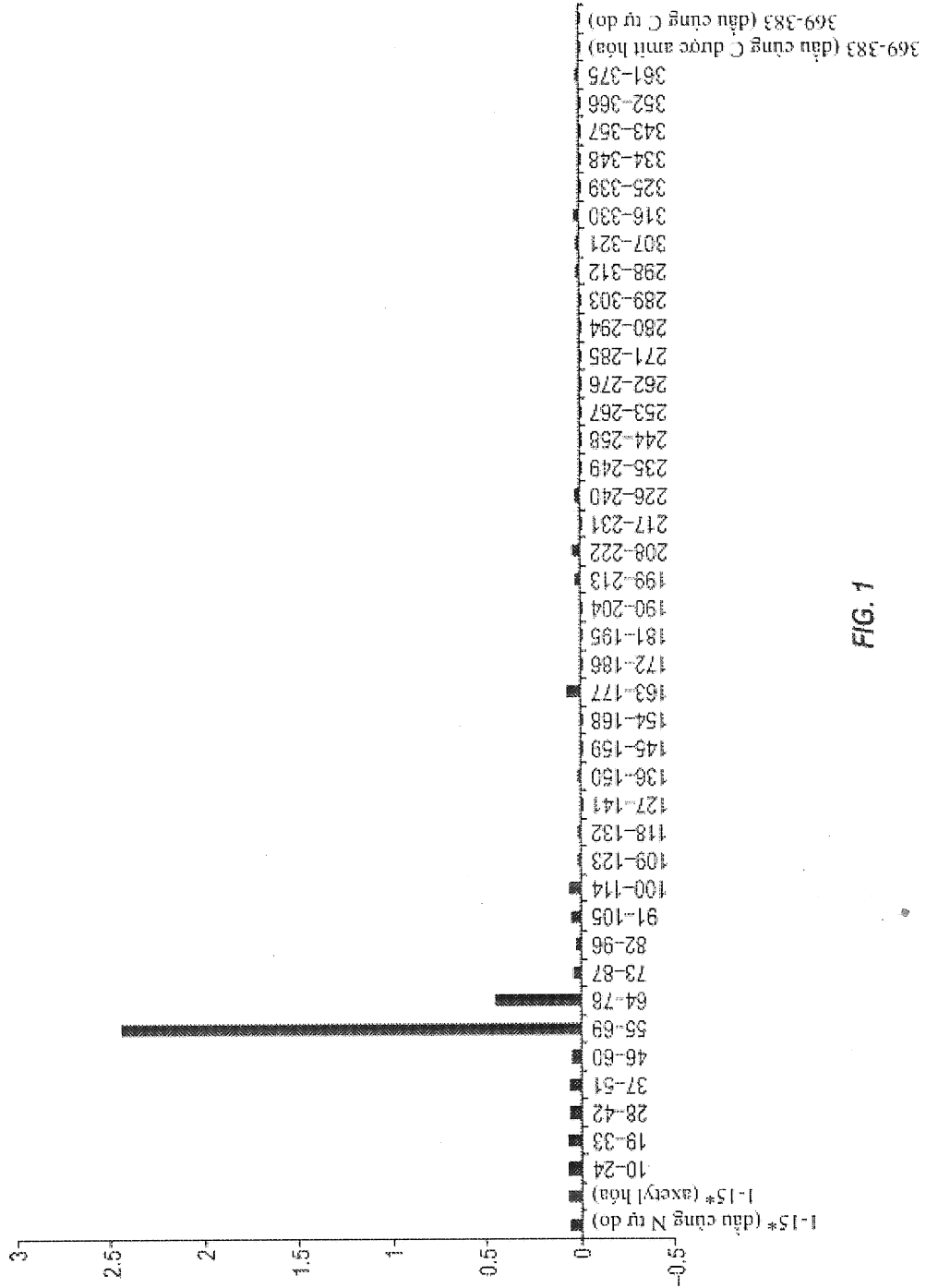


FIG. 1

Các bắt cặp của VH 16G7 của chuột/được làm tương thích với người:

Chính

EVQLXGGGSLVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWVQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	10	20	30	40	50	60
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	1667 VH protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv1 protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv2 protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv2a protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv2aB7 protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv2b protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv2bH7 protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv3 protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv4 protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv5 protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv5V protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv6a protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv6b protein					
EVQLKPSVLRGASVSKSKASGYTFTSSWIHWQRPGQGLEWIGLEIYPNSGNTNY	h16G7VHv7 protein					

Chính

NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	70	80	90	100	110
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	1667 VH protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv1 protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv2 protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv2a protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv2aB7 protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv2b protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv2bH7 protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv3 protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv4 protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv5 protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv5V protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv6a protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv6b protein				
NEKFKGKRLTVVDISISTAYNELLSLSTAVYCARLGLWLIPLDYWGQGTITVYSS	h16G7VHv7 protein				

FIG. 2

SEQ ID NO:52

SEQ ID NO:7
 SEQ ID NO:15
 SEQ ID NO:16
 SEQ ID NO:17
 SEQ ID NO:18
 SEQ ID NO:19
 SEQ ID NO:20
 SEQ ID NO:21
 SEQ ID NO:22
 SEQ ID NO:23
 SEQ ID NO:24
 SEQ ID NO:25
 SEQ ID NO:26
 SEQ ID NO:27

Các bất cặp của VL 16G7 của chuỗi/được làm tương thích với người:

Chính	DIVLTQSPFSSLAIVSVGEEKVINSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQOKPFGQSPKLLXYWA	10	20	30	40	50		
16G7 VL protein	DIVLTQSPFSSLAIVSVGEEKVINSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQOKPFGQSPKLLXYWA							57
B16G7VLv1 protein	DIVLTQSPFSSLAIVSVGEEKVINSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQOKPFGQSPKLLXYWA							57
Bu16G7VLv2 protein	DIVLTQSPFSSLAIVSVGEEKVINSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQOKPFGQSPKLLXYWA							57
Bu16G7VLv3 protein	DIVLTQSPFSSLAIVSVGEEKVINSCKSSQSLLDGNDQKNYLAWYQOKPFGQSPKLLXYWA							57
Chính	STRESGVFDREFSGSGGIDFTLTISSLQAEEDVAVVYCCQFYDYFWTFEGGGTKLEIKR	80	70	80	90	100	110	
16G7 VL protein	STRESGVFDREFSGSGGIDFTLTISSLQAEEDVAVVYCCQFYDYFWTFEGGGTKLEIKR							114
B16G7VLv1 protein	STRESGVFDREFSGSGGIDFTLTISSLQAEEDVAVVYCCQFYDYFWTFEGGGTKLEIKR							114
Bu16G7VLv2 protein	STRESGVFDREFSGSGGIDFTLTISSLQAEEDVAVVYCCQFYDYFWTFEGGGTKLEIKR							114
Bu16G7VLv3 protein	STRESGVFDREFSGSGGIDFTLTISSLQAEEDVAVVYCCQFYDYFWTFEGGGTKLEIKR							114

FIG. 3

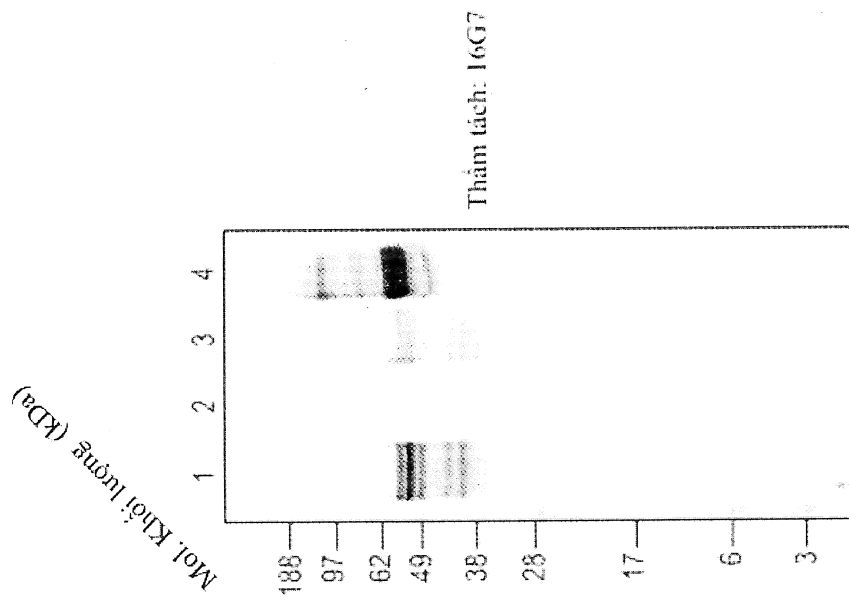


FIG. 4A

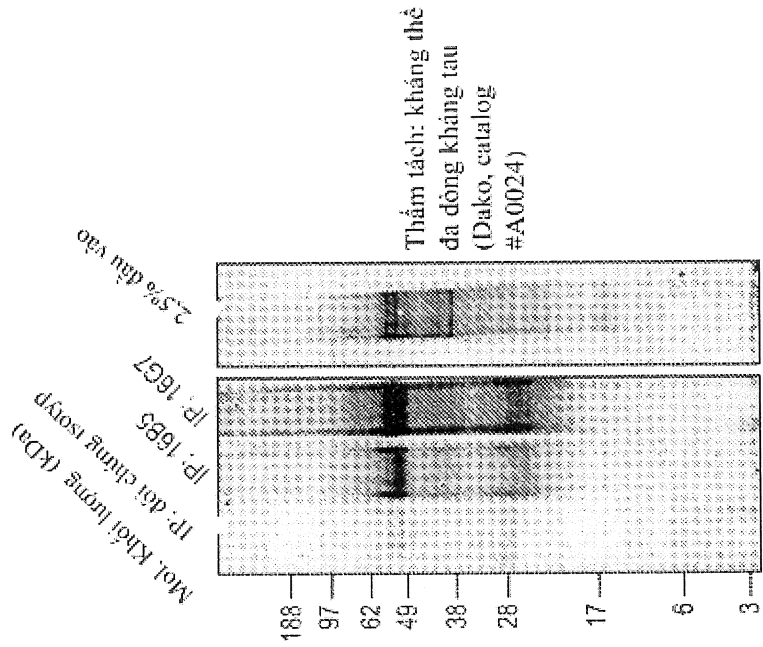


FIG. 4B

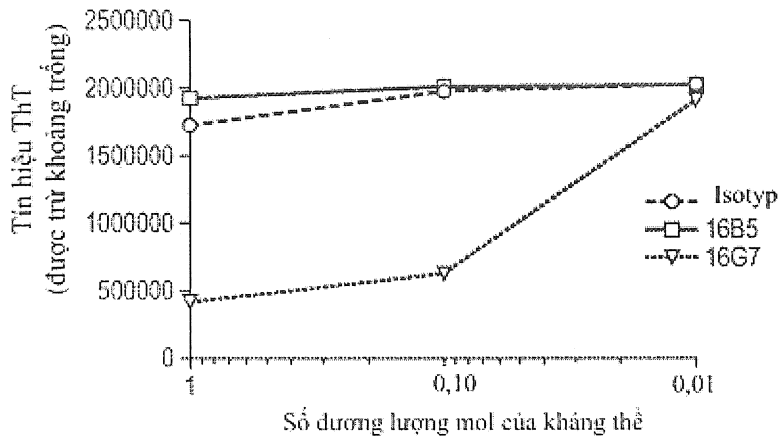


FIG. 5

16G7	k liên hợp	k phân ly	K_D
Tau người	1,64E6	5,63E-4	3,42E-10

FIG. 6

Tên	$k_a(M^{-1}s^{-1})$	$k_d(s^{-1})$	$K_D(pM)$
hu16G7VHv2a /hu16G7VLv2	3×10^6	$8,33 \times 10^{-4}$	277
hu16G7VHv2b/hu16G7VLv2	$3,52 \times 10^6$	$1,07 \times 10^{-3}$	303
hu16G7VHv7/hu16G7VLv2	$4,89 \times 10^6$	$1,43 \times 10^{-3}$	293
Khám	$2,9 \times 10^6$	$5,4 \times 10^{-4}$	187

FIG. 7

— Pha liên hợp/Tiêm mẫu
- - - - - Pha phân ly

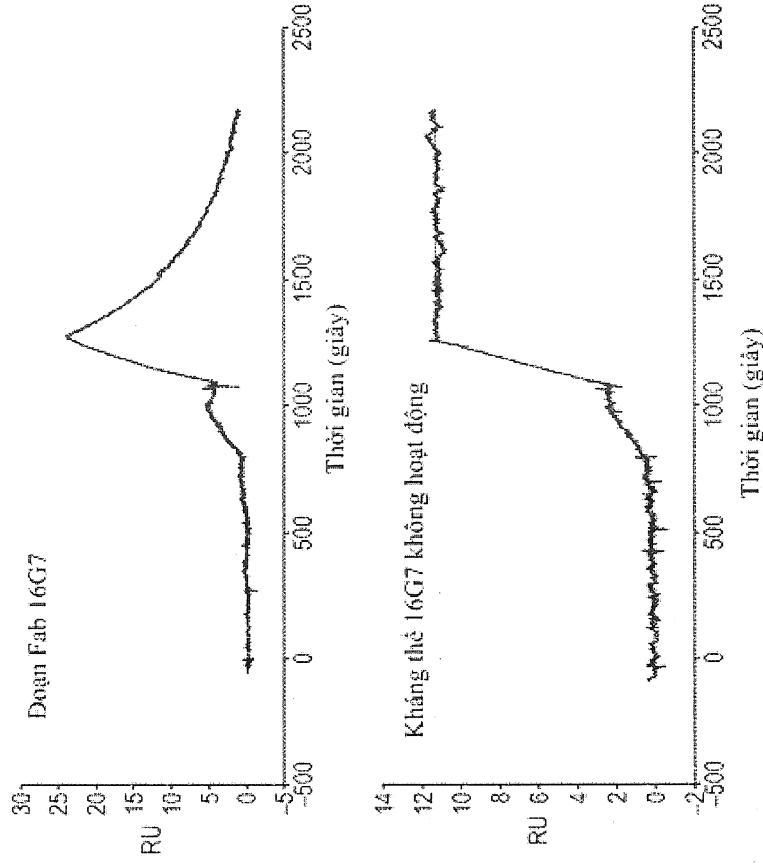


FIG. 8