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

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

(11) **1-0048986**

(51)[8] **C07K 16/18**; G01N 33/68

(13) **B**

(21) 1-2018-05388
(22) 02/05/2017
(86) PCT/IB2017/052544 02/05/2017
(87) WO 2017/191560 09/11/2017
(30) 62/330,789 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); ALEXANDER, Svetlana (US); RENZ, Mark (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) 1-2018-05388

(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 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.

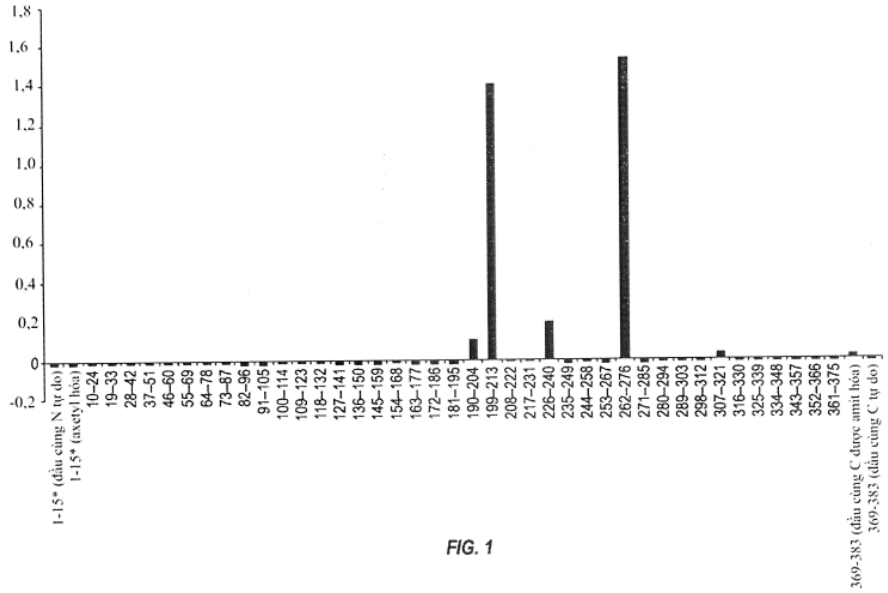


FIG. 1

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 chung (t-tau, *nghĩa là*, dạng được phosphoryl hóa và không được phosphoryl hóa) và phospho-tau (p-tau, *nghĩa là*, tau được phosphoryl hóa) được giải phóng bởi não đáp ứng với sự tổn thương nơron và thoái hóa thần kinh và đã được báo cáo là xảy ra với mức độ gia tăng trong CSF của bệnh nhân Alzheimer so với quần thể chung (Jack 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 xác nhận bệnh Alzheimer. Các đám rối tạo thành các sợi bất thường có đường kính 10 nm xuất hiện theo cặp được cuộn theo kiểu xoắn với chu kỳ ổn định là 80 nm. Tau nằm trong các đám rối thần kinh bị phosphoryl hóa bất thường (bị tăng phosphoryl hóa) với các nhóm phosphat được gắn vào các vị trí cụ thể trên phân tử. Sự liên quan chặt chẽ của các đám rối thần kinh được quan sát thấy trong các nơron lớp II của vỏ não khứu, các vùng CA1 và vùng nền của hồi hải mã, hạch hạnh nhân, và các lớp sâu hơn (lớp III, V, và mặt ngoài VI) của vỏ não mới ở bệnh Alzheimer. Tau bị phosphoryl hóa tăng cũng được báo cáo là cản trở sự lắp ráp vi ống, điều này có thể thúc đẩy sự phá vỡ mạng nơron.

Các thể vùi Tau là một phần của bệnh học thần kinh xác định của một số bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm bệnh Alzheimer, bệnh thoái hóa thùy trán thái dương, bệnh liệt trên nhân 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 trong các gốc axit amin 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334 của SEQ ID NO:1).

Một số kháng thể này cạnh tranh để liên kết với tau người với kháng thể 3D6. Một số kháng thể này liên kết với cùng một epitop trên tau người với 3D6.

Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng của kháng thể đơn dòng 3D6, trong đó 3D6 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 3D6 hoặc dạng khảm, được ngụy trang, hoặc được làm tương thích với người của nó. Trong một số kháng thể, chuỗi nặng biến đổi có sự đồng nhất ≥ 85% với trình tự người. Trong một số kháng thể, chuỗi nhẹ biến đổi có sự đồng nhất ≥ 85% với trình tự người. Trong một số kháng thể, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có sự đồng nhất ≥ 85% với trình tự dòng mầm của người.

Trong một số kháng thể, 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 H27 bị chiếm bởi F hoặc Y, H28 bị chiếm bởi N hoặc T, H29 bị chiếm bởi I hoặc F, H30 bị chiếm bởi K hoặc T, vị trí H51 bị chiếm bởi I hoặc V, vị trí H54 bị chiếm bởi N hoặc D, vị trí H60 bị chiếm bởi D hoặc A, H61 bị chiếm bởi P hoặc E, và H102 bị chiếm bởi F hoặc Y. Trong một số kháng thể này, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42. Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 58. Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 59. Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 60. Trong một số kháng thể, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 43. Trong một số kháng thể, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 61. Trong một số kháng thể, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 62. Trong một số kháng

thể, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 63. Trong một số kháng thể, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 64. Trong một số kháng thể, CDR-H3 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 65.

Trong một số kháng thể, kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người. Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 43. Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:61 Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:64 Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:63, và CDR-H3 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:65. Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 58 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:62 Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 59 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:63 Trong một số kháng thể, CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 60 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:62.

Một số kháng thể là kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hoặc khảm liên kết đặc hiệu với tau người, trong đó 3D6 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 3D6 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 3D6. Trong một số kháng thể, các CDR có định nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, Tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Tổ hợp Kabat/Chothia của 3D6 (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 3D6 (SEQ ID NO: 12-14).

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat của 3D6 (SEQ ID NO:32, 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 3D6 (SEQ ID NO: 12-14).

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Chothia của 3D6 (SEQ ID NO:33, SEQ ID NO:34, 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 3D6 (SEQ ID NO: 12-14).

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM của 3D6 (SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:35, 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 3D6 (SEQ ID NO: 12-14).

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact của 3D6 (SEQ ID NO:39-41) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact của 3D6 (SEQ ID NO:36-38).

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 90% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:15-19 và SEQ ID NO:46-57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 90% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 20-23, ngoại trừ là vị trí H17 có thể là T hoặc S, và vị trí H20 có thể là I hoặc V.

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: H38 bị chiếm bởi R và H93 bị chiếm bởi S. Trong một số kháng thể này, các vị trí H38 và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và S.

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: H38 bị chiếm bởi R, H43 bị chiếm bởi Q, H83 bị chiếm bởi T, và H93 bị chiếm bởi S. Trong một số kháng thể, các vị trí H38, H43, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, Q, T, và S.

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: H12 bị chiếm bởi V, H24 bị chiếm bởi A,

H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, H81 bị chiếm bởi Q, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H24, H48, H67, H80, H81, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, I, A, L, Q, và F.

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: H13 bị chiếm bởi R và H66 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể, các vị trí H13 và H66 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và K.

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: H40 bị chiếm bởi R và H82a bị chiếm bởi G. Trong một số kháng thể, các vị trí H40 và H82a trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và G.

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: H42 bị chiếm bởi E và H76 bị chiếm bởi N. Trong một số kháng thể, các vị trí H42 và H76 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E và N.

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: H40 bị chiếm bởi R, H82a bị chiếm bởi G, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể, các vị trí H40, H82a, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, G, và T.

Trong một số kháng thể, vị trí H12 trong vùng VH bị chiếm bởi V.

Trong một số kháng thể, vị trí H80 trong vùng VH bị chiếm bởi L.

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: H24 bị chiếm bởi A, H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể, các vị trí H24, H48, H67, H80, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A, I, A, L, và F.

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: H43 bị chiếm bởi Q, và H81 bị chiếm bởi Q. Trong một số kháng thể, các vị trí H43 và H81 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, và Q.

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: H24 bị chiếm bởi A, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể, các vị trí H24 và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A và F.

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: H13 bị chiếm bởi R, H17 bị chiếm bởi L, H29 bị chiếm bởi F, H42 bị chiếm bởi E, H43 bị chiếm bởi Q, H61 bị chiếm bởi E, H76 bị chiếm bởi N, H80 bị chiếm bởi L, H81 bị chiếm bởi Q. Trong một số kháng thể, các vị trí H13, H17, H29, H42, H43, H61, H76, H80, và H81 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, F, E, Q, E, N, L, và Q.

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: H24 bị chiếm bởi A, H28 bị chiếm bởi T, H48 bị chiếm bởi I, H54 bị chiếm bởi D, H60 bị chiếm bởi A, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể, các vị trí H24, H28, H48, H54, H60, H67, H80, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A, T, I, D, A, A, L, và F.

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: H10 bị chiếm bởi D, H17 bị chiếm bởi L, H24 bị chiếm bởi A, H28 bị chiếm bởi T, H43 bị chiếm bởi Q, H48 bị chiếm bởi I, H60 bị chiếm bởi A, H61 bị chiếm bởi E, H91 bị chiếm bởi F, H108 bị chiếm bởi T, và H109 bị chiếm bởi L. Trong một số kháng thể, các vị trí H10, H17, H24, H28, H43, H48, H60, H61, H91, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, L, A, T, Q, I, A, E, F, T, và L.

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: H17 bị chiếm bởi L, H27 bị chiếm bởi Y, H29 bị chiếm bởi F, và H61 bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể, các vị trí H17, H27, H29, và H61 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, 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: H17 bị chiếm bởi L, H27 bị chiếm bởi Y, H29 bị chiếm bởi F, H61 bị chiếm bởi E, H76 bị chiếm bởi N, và H82a bị chiếm bởi G. Trong

một số kháng thể, các vị trí H17, H27, H29, H61, H76, và H82a trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, E, N, và G.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H17 bị chiếm bởi L, H24 bị chiếm bởi A, H43 bị chiếm bởi Q, H48 bị chiếm bởi I, H83 bị chiếm bởi T, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H17, H24, H43, H48, H83, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, A, Q, I, T, F.

Trong một số kháng thể, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H24 bị chiếm bởi A, H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, H83 bị chiếm bởi T, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H24, H48, H67, H80, H83, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, I, A, L, T, và F.

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: H10 bị chiếm bởi E hoặc D, H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H13 bị chiếm bởi K hoặc R, H17 bị chiếm bởi T, L hoặc S, H24 bị chiếm bởi V hoặc A, H27 bị chiếm bởi F hoặc Y, H28 bị chiếm bởi N hoặc T, H29 bị chiếm bởi I hoặc F, H30 bị chiếm bởi K hoặc T, H38 bị chiếm bởi Q hoặc R, H40 bị chiếm bởi A hoặc R, H42 bị chiếm bởi G hoặc E, H43 bị chiếm bởi K hoặc Q, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H51 bị chiếm bởi V hoặc I, H54 bị chiếm bởi N hoặc D, H60 bị chiếm bởi D hoặc A, H61 bị chiếm bởi P hoặc E, H66 bị chiếm bởi R hoặc K, H67 bị chiếm bởi V hoặc A, H76 bị chiếm bởi D hoặc N, H80 bị chiếm bởi M hoặc L, H81 bị chiếm bởi E hoặc Q, H82a bị chiếm bởi S hoặc G, H83 bị chiếm bởi T hoặc R, H91 bị chiếm bởi Y hoặc F, H93 bị chiếm bởi A hoặc S, H102 bị chiếm bởi F hoặc Y, H108 bị chiếm bởi T hoặc L, H109 bị chiếm bởi L hoặc V. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H13, H17, H24, H38, H42, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, L, A, R, E, Q, I, K, A, N, L, Q, T, F, và S.

Trong một số kháng thể, các vị trí H38, H42, H43, H76, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, E, Q, N, T, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H13, H17, H24, H38, H40, H42, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, L, A, R, R, E, Q, I, K, A, N, L, Q, G, T, F, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H24, H38, H40, H43, H48, H67,

H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, R, R, Q, I, A, L, Q, G, T, F, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H43, H48, H54, H60, H67, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, T, R, R, Q, I, D, A, A, L, Q, G, T, F, và S.

Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H48, H51, H54, H60, H67, H80, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, T, R, R, I, V, D, A, A, L, G, T, F, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H48, H54, H60, H67, H80, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng lần lượt VH bị chiếm bởi V, A, T, R, R, I, D, A, A, L, G, T, F, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H13, H17, H24, H29, H38, H40, H42, H43, H54, H61, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, A, F, R, R, E, Q, N, E, N, L, Q, G, T, F, và S.

Trong một số kháng thể, các vị trí H13, H17, H24, H27, H28, H29, H30, H38, H40, H42, H43, H51, H54, H60, H61, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, A, Y, T, F, T, R, R, E, Q, V, D, A, E, N, L, Q, G, T, F, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H10, H12, H17, H24, H28, H38, H40, H42, H43, H48, H54, H60, H61, H76, H80, H82A, H83, H91, H93, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, V, L, A, T, R, R, E, Q, I, N, A, E, N, L, G, T, F, S, T, và L. Trong một số kháng thể, các vị trí H10, H12, H17, H24, H28, H38, H40, H43, H48, H51, H54, H60, H61, H82A, H83, H91, H93, H102, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, V, L, A, T, R, R, Q, I, V, D, A, E, G, T, F, S, Y, T, và L.

Trong một số kháng thể, các vị trí H38 và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H17, H27, H29, H38, H61, H76, H82A, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, R, E, N, G, và S. Trong một số kháng thể, các vị trí H17, H27, H28, H29, H30, H38, H51, H54, H60, H61, H76, H82A, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, T, F, T, R, V, D, A, E, N, G, và S.

Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H38, H40, H48, H66, H67, H76, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, R, I, K, A, N, L, G, T, và S.

Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H17, H27, H29, H38, H40, H61, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, Y, F, R, R, E, L, G, T, và

S. Trong một số kháng thể, các vị trí H12, H17, H27, H28, H29, H30, H38, H40, H51, H54, H60, H61, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, Y, T, F, T, R, R, V, D, A, E, L, G, T, và S.

Trong một số kháng thể này, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L36 bị chiếm bởi L, L37 bị chiếm bởi L, và L100 bị chiếm bởi G. Trong một số kháng thể, các vị trí L36, L37, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L, và G.

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

Trong một số kháng thể này, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 là V hoặc I, L7 là S hoặc T, L12 là P hoặc S, L15 là L hoặc I, L36 là L, L37 là L, L45 là R hoặc K, L60 là D hoặc S, L100 là G.

Trong một số kháng thể, các vị trí L12, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, K, và G. Trong một số kháng thể, các vị trí L36, L37, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L và G. Trong một số kháng thể, các vị trí L36, L37, L60 và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L, S và G. Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L7, L12, L15, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi I, T, S, I, L, L, K, và G. Trong một số kháng thể, các vị trí L2, L7, L12, L15, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, S, P, L, L, L, R, và G.

Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 95% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 15-19, 46-57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 95% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 20-23, ngoại trừ là vị trí H17 có thể là T hoặc S, và vị trí H20 có thể là I hoặc V. Một số kháng thể chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 98% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 15-19, 46-57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 98% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 20-23, ngoại trừ là vị trí H17 có thể là T hoặc S, và vị trí H20 có thể là I hoặc V.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:15-19 và SEQ ID NO:46-57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:20-23. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:18 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:19 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:19 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:19 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:19 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự

axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:49 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:49 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:49 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:49 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi

nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin

của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành

có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

Ví dụ, kháng thể này có thể là kháng thể khảm. Ví dụ, kháng thể này có thể là kháng thể được ngụy trang.

Kháng thể này có thể là kháng thể chuột không hoạt động, khảm, được ngụy trang 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 trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng. Vùng hằng định chuỗi nặng của một số kháng thể là dạng đột biến của vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người có khả năng liên kết với thụ thể Fcγ 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, vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic này và tế bào chủ được biến nạp bằng vectơ 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 3D6, trong đó 3D6 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 ngụy trang, ví dụ các dạng được làm tương thích với người, khảm hoặc được ngụy trang của 3D6, 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 vectơ 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 vectơ này gia tăng, phân lập từng tế bào từ các tế bào đã chọn lọc; và tạo ngân hàng tế bào được tách dòng từ từng tế bào được chọn lọc dựa trên hiệu suất của kháng thể.

Một số tế bào có thể được nhân giống trong các điều kiện chọn lọc và được sàng lọc cho các dòng tế bào biểu hiện tự nhiên và tiết ra ít nhất là 100 mg/L/10^6 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 3D6.

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 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 3D6.

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 ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP). Trong một số phương pháp, bệnh liên quan đến tau là bệnh Alzheimer. Trong một số phương pháp bệnh nhân này là người mang ApoE4.

Cũng được 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 ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân

tiến triển (PSP). Trong một số phương 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 cắt lớp phát xạ positron (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 lắng đọng protein tau thứ nhất ở đối tượng trước khi điều trị bằng cách sử dụng cho đối tượng kháng thể được mô tả ở đây, và phát hiện lượng kháng thể thứ nhất đã liên kết với tau ở đối tượng, sử dụng phương pháp điều trị này cho đối tượng, đo mức lắng đọng protein tau thứ hai ở đối tượng này sau khi điều trị bằng cách sử dụng cho đối tượng kháng thể này, và phát hiện kháng thể đã được liên kết với Tau ở đối tượng, trong đó sự giảm mức lắng đọng protein tau thể hiện đáp ứng tích cực với điều trị.

Sáng chế còn 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 lắng đọng protein tau thứ nhất ở đối tượng trước khi điều trị bằng cách sử dụng cho đối tượng kháng thể được mô tả ở đây, và phát hiện lượng kháng thể thứ nhất đã liên kết với tau ở đối tượng, sử dụng phương pháp điều trị này cho đối tượng, đo mức lắng đọng protein tau thứ hai ở đối tượng này sau khi điều trị bằng cách sử dụng cho đối tượng kháng thể này, và phát hiện lượng kháng thể thứ hai đã được liên kết với tau ở đối tượng này, trong đó sự không thay đổi mức lắng đọng protein tau hoặc sự tăng nhẹ các lắng đọng protein tau thể hiện đáp ứng tích cực với điều trị.

Mô tả vắt 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 3D6 của chuột.

Fig.2 mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 3D6 (VHv1, VHv2, VHv1b, VHv1bA11, và VHv5). Trình tự axit amin liên ứng trong số các vùng

biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 3D6 (VHv1, VHv2, VHv1b, VHv1bA11, và VHv5) được đánh dấu là "Chính". 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 3D6 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 3D6 (VHv1, VHv2, VHv1b, VHv1bA11, và VHv5) 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 3D6 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 3D6 . Trình tự axit amin liên ứng giữa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 của chuột và các kháng thể 3D6 được làm tương thích với người đã chọn được đánh dấu là "Chính". Các CDR như được xác định bởi Kabat được in đậm. Các vị trí trong các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 3D6 trong đó các gốc axit amin khác với trình tự "Chính" được đóng khung.

Fig.4A và Fig.4B mô tả sự sắp xếp thẳng hàng các vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 của chuột và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 3D6 (VHv1, VHv1b, VHv1bA11, VHv1bA11B6G2, VHv1bA11B6H3, VHv1c, VHv1d, VHv1e, VHv1f, VHv2, VHv3, VHv3b, VHv3c, VHv4, VHv4b, VHv4c, và VHv5). Trình tự axit amin liên ứng trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng của các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 3D6 (VHv1, VHv1b, VHv1bA11, VHv1bA11B6G2, VHv1bA11B6H3, VHv1c, VHv1d, VHv1e, VHv1f, VHv2, VHv3, VHv3b, VHv3c, VHv4, VHv4b, VHv4c, và VHv5) được đánh dấu là "Chính". 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 các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 3D6 (VHv1, VHv1b, VHv1bA11, VHv1bA11B6G2, VHv1bA11B6H3, VHv1c, VHv1d, VHv1e, VHv1f, VHv2, VHv3, VHv3b, VHv3c, VHv4, VHv4b, VHv4c, và VHv5) trong đó các gốc axit amin khác với trình tự "Chính" được đóng khung.

Fig.5A, Fig.5B, và Fig.5C mô tả kết quả của các thử nghiệm sàng lọc ELISA cho các kháng thể kháng tau đơn dòng của chuột đã chọn lọc.

Fig.6 mô tả động học liên kết cho các kháng thể kháng tau đơn dòng của chuột đã chọn lọc với tau người tái tổ hợp.

Fig.7 mô tả kết quả của các thử nghiệm phong bế chức năng cho các kháng thể kháng tau đơn dòng của chuột đã chọn lọc.

Fig.8 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.9 mô tả kết quả của các thử nghiệm chỉ ra rằng 3D6 và 5G8 bắt giữ miễn dịch tau từ mô bệnh Alzheimer của người.

Fig.10A, Fig.10B, và Fig.10C mô tả kết quả của các thử nghiệm thể hiện ái lực của các biến thể 3D6 được làm tương thích với người đối với tau.

Mô tả vắn tắt các 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 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 8 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO:9 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 10 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 11 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 của chuột và của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO: 12 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột và của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO: 13 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột và của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO: 14 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột và của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:15 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1.

SEQ ID NO:16 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv2.

SEQ ID NO:17 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1b.

SEQ ID NO:18 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1bA11.

SEQ ID NO:19 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv5.

SEQ ID NO:20 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VLv1.

SEQ ID NO:21 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VLv2.

SEQ ID NO:22 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VLv3.

SEQ ID NO:23 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VLv4.

SEQ ID NO:24 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nặng Acc.# BAC01986.1.

SEQ ID NO:25 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nặng Acc.# IMGT# IGHV1-69-2*01.

SEQ ID NO:26 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nặng Acc.# IMGT#IGKJ1*01.

SEQ ID NO:27 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ Acc. # IMGT#IGKV2-30*02

SEQ ID NO:28 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ Acc. # IMGT#IGKJ2*01.

SEQ ID NO:29 thể hiện trình tự axit amin của trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ Acc.# AAZ09048.1.

SEQ ID NO: 30 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 31 thể hiện trình tự axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 32 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Kabat của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 33 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Chothia của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 34 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Chothia của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 35 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 AbM của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 36 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L1 Contact của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 37 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L2 Contact của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 38 thể hiện trình tự axit amin của CDR-L3 Contact của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 39 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Contact của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 40 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Contact của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 41 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Contact của kháng thể 3D6 của chuột.

SEQ ID NO: 42 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv5, hu3D6VHv1bA11B6G2, hu3D6VHv1bA11B6H3, hu3D6VHv1e, và hu3D6VHv1f).

SEQ ID NO: 43 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv5 và hu3D6VHv1bA11B6H3).

SEQ ID NO:44 thể hiện trình tự axit amin liên ứng trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng của 3D6 của chuột và các kháng thể 3D6 được làm tương thích với người đã chọn (VHv1, VHv2, VHv1b, VHv1bA11, và VHv5) (được đánh dấu là “Chính" trong Fig.2).

SEQ ID NO:45 thể hiện trình tự axit amin liên ứng giữa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ của 3D6 của chuột và các kháng thể 3D6 được làm tương thích với người đã chọn (được đánh dấu là “Chính" trong Fig.3).

SEQ ID NO:46 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1bA11B6G2.

SEQ ID NO:47 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1bA11B6H3.

SEQ ID NO:48 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1c.

SEQ ID NO:49 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1d.

SEQ ID NO:50 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1e.

SEQ ID NO:51 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv1f.

SEQ ID NO:52 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv3.

SEQ ID NO:53 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv3b.

SEQ ID NO:54 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv3c.

SEQ ID NO:55 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv4.

SEQ ID NO:56 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv4b.

SEQ ID NO:57 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người hu3D6VHv4c.

SEQ ID NO: 58 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VH1c).

SEQ ID NO: 59 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c, và hu3D6VHv4c).

SEQ ID NO: 60 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv3b và hu3D6VHv4b).

SEQ ID NO: 61 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv1bA11B6G2).

SEQ ID NO: 62 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b, và hu3D6VHv4b).

SEQ ID NO: 63 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c, và hu3D6VHv4c).

SEQ ID NO: 64 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv1e).

SEQ ID NO: 65 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat khác của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người (thu được từ hu3D6VHv1f).

SEQ ID NO:66 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO: 67 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:68 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H2 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO: 69 thể hiện trình tự axit amin của CDR-H3 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

SEQ ID NO:70 thể hiện trình tự axit amin của vùng VH của kháng thể chuột (mã pdb 1CR9) được sử dụng làm khuôn cấu trúc để làm cho chuỗi nặng tương thích với người.

SEQ ID NO:71 thể hiện trình tự axit amin liên ứng trong số các vùng biến đổi chuỗi nặng của các kháng thể 3D6 được làm tương thích với người đã chọn (VHv1, VHv1b, VHv1bA11, VHv1bA11B6G2, VHv1bA11B6H3, VHv1c, VHv1d, VHv1e, VHv1f, VHv2, VHv3, VHv3b, VHv3c, VHv4, VHv4b, VHv4c, và VHv5) (được đánh dấu "Chính" trong Fig.4A và 4B).

SEQ ID NO: 72 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng của kháng thể 3D6 khảm.

SEQ ID NO: 73 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 khảm.

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 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 dược dụng hoặc tá dược lỏng khác được dự định tạo thuận lợi cho việc sử dụng nó. Đôi khi, các kháng thể đơn dòng tinh khiết ít nhất là 60%, 70%, 80%, 90%, 95% hoặc 99% khối lượng/khối lượng đối với protein nhiễu và các tạp chất từ quá trình sản xuất hoặc tinh chế. Thông thường, kháng thể đơn dòng đã phân lập hoặc thực thể sinh học khác là dạng đại phân tử chiếm ưu thế còn lại sau khi tinh chế nó.

Liên kết đặc hiệu của kháng thể với kháng nguyên đích của nó có nghĩa là ái lực và/hoặc lực hấp dẫn 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 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 kapa hoặc lambda. Các chuỗi nặng được phân loại là gama, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, và lần lượt xác định isotyp của kháng thể là IgG, IgM, IgA, IgD và IgE. Trong các chuỗi nhẹ và nặng, các vùng biến đổi và hằng định

được nối bằng vùng "J" chứa khoảng 12 hoặc nhiều axit amin, với chuỗi nặng còn bao gồm vùng "D" chứa khoảng 10 hoặc nhiều axit amin. *Xem tổng quan*, *Fundamental Immunology*, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích).

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

khác, và kháng thể trong đó CDR H1 là CDR H1 tổ hợp Chothia-Kabat và các CDR khác chứa các gốc CDR Kabat và không chứa các gốc CDR bổ sung theo các định nghĩa khác.

Bảng 1:

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

Vòng	Kabat	Chothia	Thể liên 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 từ đó thu được chúng 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)c, 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 3D6 được làm tương thích với người và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ đặc hiệu với một epitop khác trên tau mà không phải là epitop được liên kết bởi 3D6.

Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, một cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ là kháng thể 3D6 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 chuyển bào qua trung gian thụ thể. Sự hấp thu kháng thể đặc hiệu kép ở não có thể còn được tăng cường bằng cách thao tác di truyền kháng thể đặc hiệu kép để làm giảm ái lực của nó với thụ thể hàng rào máu não. Ái lực với thụ thể này được làm giảm dẫn đến sự phân bố kháng thể này trong não rộng hơn (*xem, ví dụ*, Atwal. *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-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, mà là thể dung hợp của hai kháng thể đime 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 đime tạo ra phân tử đa hóa trị; (4) phân tử được gọi là phân tử "neo và khóa", dựa trên "vùng chức năng đime 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 duy nhất. Các phương pháp xác định cấu hình không gian của epitop bao gồm, ví dụ, phương pháp tinh thể học tia x và cộng hưởng từ hạt nhân 2 chiều. *Xem, ví dụ*, Epitope Mapping Protocols, trong Methods in Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996)).

Các kháng thể nhận biết cùng epitop hoặc các epitop 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 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 bổ trợ là tương thích với các thành phần còn lại của chế phẩm này và gần như không độc với người nhận nó.

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

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

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

Thuật ngữ "mẫu đối chứng" dùng để chỉ mẫu sinh học chưa biết hoặc 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 một lúc với mẫu sinh học được cho là mang bệnh liên quan đến tau hoặc vào một thời điểm khác. Mẫu sinh học và mẫu đối chứng có thể đều thu được từ cùng một mô. Tốt hơn là, các mẫu đối chứng chủ yếu chứa hoặc chứa hoàn toàn các vùng bình thường, khỏe mạnh và có thể được sử dụng để so sánh với mẫu sinh học được cho là chứa các vùng bị mắc bệnh liên quan đến tau. Tốt hơn là, mô trong mẫu

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

Thuật ngữ "bệnh" dùng để chỉ điều kiện 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 sỹ điều trị.

Thuật ngữ "đáp ứng tích cực với điều trị" đề cập đến đáp ứng tốt hơn ở một bệnh nhân đơn lẻ hoặc đáp ứng trung bình tốt 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 tồn hay không bảo tồn, các axit amin được chia thành các nhóm sau: Nhóm I (các chuỗi bên kỵ nước): met, ala, val, leu, ile; Nhóm II (các chuỗi bên trung tính ưa nước): xys, ser, thr; Nhóm III (các chuỗi bên axit): asp, glu; Nhóm IV (các chuỗi bên bazơ): asn, gln, his, lys, arg; Nhóm V (các gốc ảnh hưởng đến hướng của chuỗi): gly, pro; và Nhóm VI (các chuỗi bên thơm): trp, tyr, phe. Sự thế bảo tồn bao gồm sự thay thế giữa các axit amin trong cùng một nhóm. Sự thế không bảo tồn là sự thay thế thành viên của một trong các nhóm này cho một thành viên thuộc nhóm khác.

Tỷ lệ phần trăm 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) được so sánh với cùng vùng đó của kháng thể tham chiếu, thì tỷ 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 tỷ lệ phần trăm.

Các chế phẩm hoặc phương pháp "chứa" hoặc "bao gồm" một hoặc nhiều yếu tố đã đề cập có thể bao gồm các yếu tố 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 biến đổi không đáng kể, như các giá trị nằm trong biên sai số chuẩn của phép đo (ví dụ, SEM) của giá trị đã cho.

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

Dạng số ít của đối tượng "một" 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 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc 257-271 hoặc 320-334 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 học liên quan đến 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 sự cắt phân giải protein tau, trong số các cơ chế khác. Các kháng thể theo sáng chế hoặc các chất cảm ứng các kháng thể này có thể được sử dụng trong các phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer và các bệnh khác bị gây ra bởi tau.

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 GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK
       250        260        270        280        290        300
SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIINK KLDLSNVQSK CGSKDNIKHV
       310        320        330        340        350        360
PGGGSVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI
       370        380        390        400        410        420
THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV
       430        440
DSPQLATLAD EVSASLAKQG L
```

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

```
        10         20         30         40         50         60
MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG
        70         80         90        100        110        120
SETSDAKSTP TAEAEEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT
```

130 140 150 160 170 180

KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR

190 200 210 220 230 240

SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK IGSTENLKHQ

250 260 270 280 290 300

PGGGKVQIIN KKLDLSNVQS KCGSKDNIKH VPGGGSVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH

310 320 330 340 350 360

HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG

370 380 390 400 410

AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

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

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI GDTPSLEDEA

70 80 90 100 110 120

AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA

130 140 150 160 170 180

PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS

190 200 210 220 230 240

AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQII NKKLDLSNVQ SKCGSKDNIK

250 260 270 280 290 300

HVPGGGSVQI VYKPVDLSKV TSKCGSLGNI HHKPGGGQVE VKSEKLDFKD RVQSKIGSLD

310 320 330 340 350 360

NITHVPGGGN KKIETHKLTF RENAKAKTDH GAEIVYKSPV VSGDTSPRHL SNVSSTGSID

370 380

MVDSPQLATL ADEVSASLAK QGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG

70 80 90 100 110 120

SETSDAKSTP TAEDVTAPLV DEGAPGKQAA AQPHTEIPEG TTAEEAGIGD TPSLEDEAAG

130 140 150 160 170 180

HVTQARMVSK SKDGTGSDDK KAKGADGKTK IATPRGAAPP GQKGQANATR IPAKTPPAPK

190 200 210 220 230 240

TPPSSGEPPK SGDRSGYSSP GSPGTPGSRS RTPSLPTPPT REPKKVAVVR TPPKSPSSAK

250 260 270 280 290 300

SRLQTAPVPM PDLKNVKSKI GSTENLKHQP GGGKVQIVYK PVDLSKVTSK CGSLGNIHHK

310 320 330 340 350 360

PGGGQVEVKS EKLDFKDRVQ SKIGSLDNIT HVPGGGNKKI ETHKLTFREN AKAKTDHGAE

370 380 390 400 410

IVYKSPVVSG DTSPRHLSNV SSTGSIDMVD SPQLATLADE VSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKESPLQT PTEDGSEEPG

70 80 90 100 110 120

SETSDAKSTP TAEAEEAGIG DTPSLEDEAA GHVTQARMVS KSKDGTGSDD KKAKGADGKT

130 140 150 160 170 180

KIATPRGAAP PGQKGQANAT RIPAKTPPAP KTPPSSGEPP KSGDRSGYSS PGSPGTPGSR

190 200 210 220 230 240

SRTPSLPTPP TREPKKVAVV RTPPKSPSSA KSRLQTAPVP MPDLKNVKSK IGSTENLKHQ

250 260 270 280 290 300

PGGGKVQIVY KPVDLSKVTS KCGSLGNIHH KPGGGQVEVK SEKLDFKDRV QSKIGSLDNI

310 320 330 340 350 360

THVPGGGNKK IETHKLTFRE NAKAKTDHGA EIVYKSPVVS GDTSPRHLSN VSSTGSIDMV

370 380

DSPQLATLAD EVSASLAKQG L

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

10 20 30 40 50 60

MAEPRQEFEV MEDHAGTYGL GDRKDQGGYT MHQDQEGDTD AGLKAEEAGI GDTPSLEDEA

70 80 90 100 110 120

AGHVTQARMV SKSKDGTGSD DKKAKGADGK TKIATPRGAA PPGQKGQANA TRIPAKTPPA

130 140 150 160 170 180

PKTPPSSGEP PKSGDRSGYS SPGSPGTPGS RSRTPSLPTP PTREPKKVAV VRTPPKSPSS

190 200 210 220 230 240

AKSRLQTAPV PMPDLKNVKS KIGSTENLKH QPGGGKVQIV YKPVDLSKVT SKCGSLGNIH

250 260 270 280 290 300

HKPGGGQVEV KSEKLDFKDR VQSKIGSLDN ITHVPGGGNK KIETHKLTFR ENAKAKTDHG

310 320 330 340 350

AEIVYKSPVV SGDTSPRHLS NVSSTGSIDM VDSPQLATLA DEVSASLAKQ GL

Việc đề cập đến tau bao gồm các biến thể tự nhiên đã biết khoảng 30 trong số này được liệt kê trong cơ sở dữ liệu Swiss-Prot và các hoán vị của chúng, cũng như các đột biến liên quan đến các bệnh tau, như chứng sa sút trí tuệ, bệnh Pick, bệnh liệt trên nhân, 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 (K3691); 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 199-213 của protein tau người 4R0N 383 axit amin (SEQ ID NO:3) (tương ứng với các gốc 257-271 của SEQ ID NO:1). Một số kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop trong các gốc 262-276 của protein tau người 4RON 383 axit amin (SEQ ID NO:3) (tương ứng với các gốc 320-334 của SEQ ID NO:1). Một số kháng thể liên kết với tau bất kể trạng thái phosphoryl hóa. Một số kháng thể liên kết với epitop không chứa gốc bị phosphoryl hóa. Các kháng thể này có thể thu được bằng cách gây miễn dịch bằng polypeptit tau được tinh chế từ nguồn tự nhiên hoặc được biểu hiện tái tổ hợp. Các kháng thể có thể được sàng lọc để 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"). 3D6 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 3D6. 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 3D6.

Các kháng thể đã đề cập trên đây có thể được tạo ra từ đầu bằng cách gây miễn dịch bằng peptit bao gồm các gốc 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc 257-271 hoặc 320-334 của SEQ ID NO:1) hoặc 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 bao gồm 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 cho 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-hydroxysucxinimit 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 các động vật phòng thí nghiệm hoặc tế bào B như được mô tả chi tiết hơn dưới đây. Các 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 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc 257-271 hoặc 320-334 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 hơn là peptit tau. Bất kỳ trong số các đồng dạng của tau có thể được sử dụng.

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết với các epitop nằm trong tau. Kháng thể được ký hiệu 3D6 là một kháng thể chuột điển hình như vậy. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 3D6 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng của 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 trong các gốc axit amin 199-213 hoặc 262-276 của protein tau người 4R0N 383 axit amin (SEQ ID NO:3) (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334, 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 bệnh lý và các cấu hình của tau, và các dạng bị gấp sai/kết tụ của tau. Kháng thể được ký hiệu 6A10 là một kháng thể chuột điển hình như vậy. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 6A10 nên được hiểu là đề cập đến bất kỳ trong số các dạng của chuột, khảm, được ngụy trang và dạng được làm tương thích với người của kháng thể này. CDR Tổ hợp Kabat/Chothia của chuỗi nặng của 6A10 được ký hiệu lần lượt là các SEQ ID NO: 67, 68, và 69, và các CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 6A10 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 12, 13, và 14. 6A10 của chuột có tỷ lệ đồng nhất trình tự VH là 82,1% và tỷ lệ đồng nhất trình tự VL là 100% với chuỗi VH và chuỗi VL, tương ứng, của 3D6 của chuột.

Một số kháng thể theo sáng chế liên kết với cùng một epitop hoặc epitop gối lên nhau với kháng thể được ký hiệu là 3D6. 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 11, tương ứng. 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 (ví dụ, 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3, lần lượt tương ứng với các gốc 257-271 hoặc 320-334 của SEQ ID NO:1) và sàng lọc các kháng thể thu được để liên kết với tau tùy ý cạnh tranh với kháng thể có các vùng biến đổi của 3D6 chuột (IgG1 kapa). 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 của các gốc xác định. Việc sàng lọc dựa trên các đột biến này xác định chính xác hơn tính đặc hiệu liên kết để cho phép nhận diện các kháng thể có khả năng liên kết bị ức chế bởi kỹ thuật gây đột biến các gốc cụ thể và các kháng thể này có

thể có chung các đặc điểm chức năng với các kháng thể điển hình khác. Các đột biến này có thể là đột biến thế thay thế hệ thống bằng alanin (hoặc serin nếu alanin đã có sẵn) một gốc một lần, hoặc các khoảng cách nhau rộng hơn, trên toàn bộ đích này hoặc toàn bộ một phần của nó trong đó được biết là có epitop này. Nếu cùng một tập hợp các đột biến làm giảm đáng kể khả năng liên kết của hai kháng thể, thì 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*, 3D6) cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng biến thể của phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. *Xem* Winter, WO 92/20791. Phương pháp này là đặc biệt thích hợp để tạo ra các kháng thể người. Trong phương pháp này, vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể chuột đã chọn được sử dụng làm nguyên liệu khởi đầu. Nếu, ví dụ, vùng biến đổi chuỗi nhẹ được chọn làm nguyên liệu khởi đầu, thư viện thể thực khuẩn được xây dựng trong đó các thành viên biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nhẹ (*nghĩa là*, nguyên liệu khởi đầu của 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 hoặc một đoạn của nó được chọn. Các kháng thể tạo thành thường có tính đặc hiệu epitop giống hoặc tương tự với nguyên liệu khởi đầu của chuột.

CDR tổ hợp Kabat/Chothia của chuỗi nặng của 3D6 được ký hiệu lần lượt là các SEQ ID NO: 8, 9, và 10, và các CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 3D6 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 12, 13, và 14.

Bảng 2 chỉ ra các CDR 3D6 như được xác định bằng Kabat, Chothia, Tổ hợp của Chothia và Kabat (còn được gọi ở đây là "Tổ hợp Kabat/Chothia"), AbM, và Contact.

Bảng 2: Các CDR 3D6 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: 36
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: 37
L3	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L97 SEQ ID NO:14	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L97 SEQ ID NO: 14	L89--L96 SEQ ID NO:38
H1	H31--H35B SEQ ID NO: 32	H26--H32 SEQ ID NO:33	H26--H35B SEQ ID NO:8	H26--H35B SEQ ID NO:8	H30--H35B SEQ ID NO:39
H2	H50--H65 SEQ ID NO: 9	H52--H56 SEQ ID NO:34	H50--H65 SEQ ID NO: 9	H50--H58 SEQ ID NO:35	H47--H58 SEQ ID NO:40
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:41

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 3D6. Các kháng thể đơn dòng mà đồng nhất ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 3D6 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 thế (*ví dụ*, các đột biến thế 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 theo quy ước bất kỳ, nhưng tốt hơn nếu là Kabat, mà đồng nhất 90%, 95%, 99% hoặc 100% với các CDR tương ứng của 3D6 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 3D6. 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 3D6 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

3D6. Các kháng thể này có thể bao gồm cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. CDR chủ yếu là từ CDR 3D6 tương ứng khi nó chứa không nhiều hơn 4, 3, 2, hoặc 1 đột biến thế, đột biến gắn xen hoặc đột biến mất đoạn, ngoại trừ CDR-H2 (khi được xác định bởi Kabat) có thể có không nhiều hơn 6, 5, 4, 3, 2, hoặc 1 đột biến thế, đột biến gắn xen hoặc đột biến mất đoạn. Các kháng thể này có thể có sự đồng nhất ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 3D6 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 3D6 ở một số lượng nhỏ các đột biến thay thế (*ví dụ*, đột biến thế bảo tồn), đột biến mất đoạn, hoặc đột biến gắn xen axit amin không quan trọng về chức năng .

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

Các kháng thể không phải của người

Quy trình sản xuất các kháng thể không phải của người khác, *ví dụ*, chuột, chuột hang, linh trưởng, thỏ hoặc chuột cống, kháng tau hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3) (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334, 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 dược. Một số loại tá dược có thể được sử dụng như được mô tả dưới đây. Tá dược Freund hoàn chỉnh sau đó là tá dược không hoàn chỉnh được ưu tiên hơn để gây miễn dịch các động vật thí nghiệm. Thỏ hoặc chuột hang 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 gốc axit amin 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3) (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334 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 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO: 3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334 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 theo quy ước 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 đồng nhất ít nhất là 85% với các trình tự kháng thể dòng mầm của người (nghĩa là, trước quá trình siêu đột biến thân). Các kháng thể hỗn hợp là các kháng thể mà một chuỗi kháng thể (ví dụ, chuỗi nặng) phù hợp giới hạn nhưng chuỗi còn lại (ví dụ, chuỗi nhẹ) không phù hợp với giới hạn. Kháng thể được phân loại là khảm nếu cả hai chuỗi đều không phù hợp với giới hạn, mặc dù các vùng khung biến đổi cho cả hai chuỗi đều gần như là của người với một số đột biến ngược của chuột. Xem, Jones 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 tỷ 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 tỷ 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 tỷ 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, tỷ lệ đồng nhất trình tự khoảng 64%, 65%, 66%, 67%, 68%, 69%, 70%, 71%, 72%, 73%, 74%, 75%, 76%, 77%, 78%, 79%, 80%, 81%, hoặc 82%, 83%, hoặc 84% với các trình tự dòng mầm của người, trong khi các chuỗi nặng khác thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 và có tỷ lệ 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 tỷ 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, tỷ 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 tỷ 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 tỷ lệ đồng nhất ít hơn 85% với trình tự dòng mầm của người được bắt cặp với các chuỗi nhẹ có tỷ 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 tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% với các trình tự dòng mầm của người được bắt cặp với chuỗi nhẹ có tỷ 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 tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% với trình tự dòng mầm người được bắt cặp với chuỗi nhẹ có tỷ lệ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% với các trình tự dòng mầm của người. Các kháng thể được làm tương thích với người bổ sung theo sáng chế thỏa mãn định nghĩa INN của WHO 2014 về "hỗn hợp" và bao gồm các kháng thể có chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO:15-19 và SEQ ID NO:46-57 được bắt cặp với chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO:20-23.

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 đó (ví dụ, các gốc H60-H65 trong CDR H2 thường là không cần thiết), từ các vùng của CDR Kabat nằm ngoài vòng siêu biến Chothia (Chothia, *J. Mol. Biol.* 196:901, 1987), bằng cách lập mô hình phân tử và/hoặc theo kinh nghiệm, hoặc như được

mô tả trong Gonzales *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 (bằng cách đánh số Kabat) trong trình tự kháng thể nhận. Số lượng các đột biến thay thế axit amin nhận cho các axit amin cho trong các CDR để bao gồm phản ánh sự cân bằng của các xem xét cạnh tranh. Các đột biến thế này có thể có lợi trong việc làm giảm số lượng axit amin chuột trong kháng thể được làm tương thích với người và do đó làm giảm khả năng gây miễn dịch tiềm tàng và/hoặc thỏa mãn định nghĩa của INN WHO về "được làm tương thích với người". Tuy nhiên, các đột biến thế cũng có thể gây ra các thay đổi về ái lực, và sự giảm đáng kể về ái lực tốt hơn, nếu tránh được. Các vị trí của đột biến thế trong các CDR và 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 BAC01986.1 (SEQ ID NO:24). 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# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25). 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#IGKJ1*01 (SEQ ID NO:26). IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25) có chung dạng chuẩn tắc của CDR-H1 và CDR-H2 chuỗi nặng 3D6 chuột . IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25) và IMGT#IGKJ1*01 (SEQ ID NO:26) và cả hai đều thuộc phân nhóm 1 chuỗi nặng người. 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#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27). 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 IMGT#IGKJ2*01 (SEQ ID NO:28). 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 AAZ09048.1 (SEQ ID NO:29). IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27) có cùng các lớp chính tắc cho CDR-L1, CDR-L2 và L3 với 3D6 chuột. IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO:27) và IMGT#IGKJ2*01 (SEQ ID NO:28) thuộc phân nhóm 2 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. Ví dụ, các vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người có mã truy cập NCBI là IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO:25) và BAC01986.1 (SEQ ID NO:24) được sử dụng làm các trình tự nhận để làm tương thích với người vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành 3D6. Ví dụ về các vị trí, trong đó hai trình tự nhận này khác nhau bao gồm các vị trí H17 (T hoặc S) và H20 (I hoặc V). Các dạng được làm tương thích với người của vùng biến đổi chuỗi nặng 3D6 có thể bao gồm mỗi axit amin ở một trong số các vị trí này.

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 thế hoặc sự đột biến của các axit amin cụ thể.

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

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

(2) là liền kề với vùng CDR hoặc nằm trong CDR như được xác định bởi Chothia nhưng không theo 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 3D6 của chuột bao gồm 17 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng được làm tương thích với người điển hình (hu3D6VHv1 (SEQ ID NO:15), hu3D6VHv2 (SEQ ID NO:16),

hu3D6VHv1b (SEQ ID NO:17), hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO:18), hu3D6VHv5 (SEQ ID NO:19), hu3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO:46) , hu3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO:47), hu3D6VHv1c (SEQ ID NO:48), hu3D6VHv1d (SEQ ID NO:49), hu3D6VHv1e (SEQ ID NO:50), hu3D6VHv1f (SEQ ID NO:51), hu3D6VHv3 (SEQ ID NO:52), hu3D6VHv3b (SEQ ID NO:53) , hu3D6VHv3c (SEQ ID NO:54), hu3D6VHv4 (SEQ ID NO:55), hu3D6VHv4b (SEQ ID NO:56), và hu3D6VHv4c (SEQ ID NO:57) và 4 vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nhẹ được làm tương thích với người điển hình (hu3D6VLv1 (SEQ ID NO:20), hu3D6VLv2 (SEQ ID NO:21, hu3D6VLv3 (SEQ ID NO:22), và hu3D6VLv4 (SEQ ID NO:23)).

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

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

Các gốc khung khác mà là các ứng viên cho sự thế là các gốc tạo ra vị trí glycosyl hóa tiềm năng. Các ứng viên khác cho sự thế 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 thế 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 sự thiếu kiểm soát quy trình.

Các kháng thể được làm tương thích với người điển hình là các dạng được làm tương thích với người của 3D6 của chuột, được ký hiệu là Hu3D6.

Kháng thể 3D6 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 17 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người điển hình: hu3D6VHv1, hu3D6VHv2, hu3D6VHv1b, hu3D6VHv1bA11, hu3D6VHv5, hu3D6VHv1bA11B6G2, hu3D6VHv1bA11B6H3, hu3D6VHv1c, hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1e, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3, hu3D6VHv3b, hu3D6VHv3c, hu3D6VHv4, hu3D6VHv4b, và hu3D6VHv4c. Sáng chế đề xuất thêm 4 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người điển hình: hu3D6VLv1, hu3D6VLv2, hu3D6VLv3, và VLv4. 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 3D6 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 bất thường về vị trí của nó trong trình tự vùng biến đổi của người và do đó có khả năng gây miễn dịch, có khả năng kết tụ, và các lý do khác, 30 vị trí khung vùng biến đổi sau đây được xem là ứng viên cho các đột biến thế trong 4 vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người điển hình và 17 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người điển hình, như được xác định thêm trong các ví dụ: L2 (V2I), L7 (S7T), L12 (P12S), L15 (L15I), L36 (F36L), L37 (Q37L), L45 (R45K), L60 (D60S), L100 (Q100G), H10 (E10D), H12 (K12V), H13 (K13R), H17 (T17L), H24 (V24A), H38 (Q38R), H40 (A40R), H42 (G42E), H43 (K43Q), H48 (M48I), H66 (R66K), H67 (V67A), H76 (D76N), H80 (M80L), H81 (E81Q), H82a (S82a-G), H83 (R83T), H91 (Y91F), H93 (A93S), H108 (L108T), và H109 (V109L). 9 vị trí CDR vùng biến đổi sau đây được xem là các ứng viên cho các đột biến thế trong 17 vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người điển hình, như được xác định thêm trong các ví dụ: H27 (F27Y), H28 (N28T), H29 (I29F),

H30 (K30T), H51 (I51V), H54 (N54D), H60 (D60A), H61 (P61E), và H102 (F102Y). Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42, và CDR-H2 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 43. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42, và CDR-H2 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 61. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 58 và CDR-H2 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 62. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42, CDR-H2 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 64, và CDR-H3 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 65. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42 và CDR-H2 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 64. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 59 và CDR-H2 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 63. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H1 Tổ hợp Kabat-Chothia có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 60 và CDR-H2 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 62.

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 điển hình bao gồm các hoán vị hoặc các tổ hợp bất kỳ của các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trưởng thành điển hình VHv1/VLv1, VHv1/VLv2, VHv1/VLv3, VHv1/VLv4, VHv2/VLv1, VHv2/VLv2, VHv2/VLv3, VHv2/VLv4, VHv1b/VLv1, VHv1b/VLv2, VHv1b/VLv3, VHv1b/VLv4, VHv1bA11/VLv1, VHv1bA11/VLv2, VHv1bA11/VLv3, VHv1bA11/VLv4, VHv5/VLv1, VHv5/VLv2, VHv5/VLv3, VHv5/VLv4, VHv1bA11B6G2/VLv1, VHv1bA11B6G2/VLv2, VHv1bA11B6G2/VLv3, VHv1bA11B6G2/VLv4, VHv1bA11B6H3/VLv1, VHv1bA11B6H3/VLv2, VHv1bA11B6H3/VLv3, VHv1bA11B6H3/VLv4,

VHv1c/VLv1, VHv1c/VLv2, VHv1c/VLv3, VHv1c/VLv4, VHv1d/VLv1, VHv1d/VLv2, VHv1d/VLv3, VHv1d/VLv4, VHv1e/VLv1, VHv1e/VLv2, VHv1e/VLv3, VHv1e/VLv4, VHv1f/VLv1, VHv1f/VLv2, VHv1f/VLv3, VHv1f/VLv4, VHv3/VLv1, VHv3/VLv2, VHv3/VLv3, VHv3/VLv4, VHv3b/VLv1, VHv3b/VLv2, VHv3b/VLv3, VHv3b/VLv4, VHv3c/VLv1, VHv3c/VLv2, VHv3c/VLv3, VHv3c/VLv4, VHv4/VLv1, VHv4/VLv2, VHv4/VLv3, VHv4/VLv4, VHv4b/VLv1, VHv4b/VLv2, VHv4b/VLv3, VHv4b/VLv4, VHv4c/VLv1, VHv4c/VLv2, VHv4c/VLv3, hoặc VHv4c/VLv4.

Sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể 3D6 được làm tương thích với người trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu3D6VHv1 (SEQ ID NO:15), hu3D6VHv2 (SEQ ID NO:16), hu3D6VHv1b (SEQ ID NO:17), hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO:18), hu3D6VHv5 (SEQ ID NO:19), hu3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO:46) , hu3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO:47), hu3D6VHv1c (SEQ ID NO:48), hu3D6VHv1d (SEQ ID NO:49), hu3D6VHv1e (SEQ ID NO:50), hu3D6VHv1f (SEQ ID NO:51), hu3D6VHv3 (SEQ ID NO:52), hu3D6VHv3b (SEQ ID NO:53) , hu3D6VHv3c (SEQ ID NO:54), hu3D6VHv4 (SEQ ID NO:55), hu3D6VHv4b (SEQ ID NO:56), và hu3D6VHv4c (SEQ ID NO:57) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện tỷ lệ đồng nhất ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với hu3D6VLv1 (SEQ ID NO:20), hu3D6VLv2 (SEQ ID NO:21, hu3D6VLv3 (SEQ ID NO:22), và hu3D6VLv4 (SEQ ID NO:23). 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, 36, 37, 38, hoặc toàn bộ 39 đột biến ngược hoặc các đột biến khác trong các SEQ ID NO:15-19 , SEQ ID NO:20-23, và SEQ ID NO:46-57) được giữ lại.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H38 bị chiếm bởi R và H93 bị chiếm bởi S. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H38 và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và S.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H38 bị chiếm bởi R, H43 bị chiếm bởi Q, H83 bị chiếm bởi T, và H93 bị chiếm bởi S. Trong một

số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H38, H43, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, Q, T, và S.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H24 bị chiếm bởi A, H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, H81 bị chiếm bởi Q, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H24, H48, H67, H80, H81, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, I, A, L, Q, và F.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H13 bị chiếm bởi R và H66 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H13 và H66 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và K.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H40 bị chiếm bởi R và H82a bị chiếm bởi G. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H40 và H82a trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và G.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H42 bị chiếm bởi E và H76 bị chiếm bởi N. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H42 và H76 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E và N.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H40 bị chiếm bởi R, H82a bị chiếm bởi G, và H83 bị chiếm bởi T. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H40, H82a, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, G, và T.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, H12 trong vùng VH bị chiếm bởi V.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, H80 trong vùng VH bị chiếm bởi L.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H24 bị chiếm bởi A, H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H24, H48, H67, H80, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A, I, A, L, và F.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H43 bị chiếm bởi Q, và H81 bị chiếm bởi Q. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H43 và H81 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, và Q.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H24 bị chiếm bởi A, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H24 và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A và F.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H13 bị chiếm bởi R, H17 bị chiếm bởi L, H29 bị chiếm bởi F, H42 bị chiếm bởi E, H43 bị chiếm bởi Q, H61 bị chiếm bởi E, H76 bị chiếm bởi N, H80 bị chiếm bởi L, H81 bị chiếm bởi Q. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H13, H17, H29, H42, H43, H61, H76, H80, và H81 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, F, E, Q, E, N, L, và Q.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H24 bị chiếm bởi A, H28 bị chiếm bởi T, H48 bị chiếm bởi I, H54 bị chiếm bởi D, H60 bị chiếm bởi A, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H24, H28, H48, H54, H60, H67, H80, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A, T, I, D, A, A, L, và F.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H10 bị chiếm bởi D, H17 bị chiếm bởi L, H24 bị chiếm bởi A, H28 bị chiếm bởi T, H43 bị chiếm bởi Q, H48 bị chiếm bởi I, H60 bị chiếm bởi A, H61 bị chiếm bởi E, H91 bị chiếm bởi F, H108 bị chiếm bởi T, và H109 bị chiếm bởi L. Trong một số kháng thể 3D6 được

làm tương thích với người, các vị trí H10, H17, H24, H28, H43, H48, H60, H61, H91, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, L, A, T, Q, I, A, E, F, T, và L.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H17 bị chiếm bởi L, H27 bị chiếm bởi Y, H29 bị chiếm bởi F, và H61 bị chiếm bởi E. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H17, H27, H29, và H61 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, và E.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H17 bị chiếm bởi L, H27 bị chiếm bởi Y, H29 bị chiếm bởi F, H61 bị chiếm bởi E, H76 bị chiếm bởi N, và H82a bị chiếm bởi G.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H17, H27, H29, H61, H76, và H82a trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, E, N, và G.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H17 bị chiếm bởi L, H24 bị chiếm bởi A, H43 bị chiếm bởi Q, H48 bị chiếm bởi I, H83 bị chiếm bởi T, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H17, H24, H43, H48, H83, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, A, Q, I, T, F.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H24 bị chiếm bởi A, H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, H83 bị chiếm bởi T, và H91 bị chiếm bởi F. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H24, H48, H67, H80, H83, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, I, A, L, T, và F.

Trong một số kháng thể 3D6 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: H10 bị chiếm bởi E hoặc D, H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H13 bị chiếm bởi K hoặc R, H17 bị chiếm bởi T, L hoặc S, H24 bị chiếm bởi V hoặc A, H27 bị chiếm bởi F hoặc Y, H28 bị chiếm bởi N hoặc T, H29 bị chiếm bởi I hoặc F, H30 bị chiếm bởi K hoặc T, H38 bị chiếm bởi Q hoặc R, H40 bị chiếm bởi A hoặc R, H42 bị chiếm bởi G hoặc E, H43 bị

chiếm bởi K hoặc Q, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H51 bị chiếm bởi V hoặc I, H54 bị chiếm bởi N hoặc D, H60 bị chiếm bởi D hoặc A, H61 bị chiếm bởi P hoặc E, H66 bị chiếm bởi R hoặc K, H67 bị chiếm bởi V hoặc A, H76 bị chiếm bởi D hoặc N, H80 bị chiếm bởi M hoặc L, H81 bị chiếm bởi E hoặc Q, H82a bị chiếm bởi S hoặc G, H83 bị chiếm bởi T hoặc R, H91 bị chiếm bởi Y hoặc F, H93 bị chiếm bởi A hoặc S, H102 bị chiếm bởi F hoặc Y, H108 bị chiếm bởi T hoặc L, H109 bị chiếm bởi L hoặc V.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H13, H17, H24, H38, H42, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, L, A, R, E, Q, I, K, A, N, L, Q, T, F, và S, như trong hu3D6VHv1. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H38, H42, H43, H76, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, E, Q, N, T, và S, như trong hu3D6VHv2. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H13, H17, H24, H38, H40, H42, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, L, A, R, R, E, Q, I, K, A, N, L, Q, G, T, F, và S, như trong hu3D6VHv1b. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H24, H38, H40, H43, H48, H67, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, R, R, Q, I, A, L, Q, G, T, F, và S như trong hu3D6VHv1bA11. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H43, H48, H54, H60, H67, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, T, R, R, Q, I, D, A, A, L, Q, G, T, F, và S như trong hu3D6VHv5. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H48, H51, H54, H60, H67, H80, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, T, R, R, I, V, D, A, A, L, G, T, F, và S như trong hu3D6VHv1bA11B6G2. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H48, H54, H60, H67, H80, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, T, R, R, I, D, A, A, L, G, T, F, và S như trong hu3D6VHv1bA11B6H3. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H13, H17, H24, H29, H38, H40, H42, H43, H54, H61, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, A, F, R, R, E, Q, N, E, N, L, Q, G, T, F, và S như trong hu3D6VHv1c. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H13, H17, H24, H27, H28, H29, H30, H38, H40, H42, H43, H51, H54, H60, H61, H76, H80, H81,

H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, A, Y, T, F, T, R, R, E, Q, V, D, A, E, N, L, Q, G, T, F, và S như trong hu3D6VHv1d. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H10, H12, H17, H24, H28, H38, H40, H42, H43, H48, H54, H60, H61, H76, H80, H82A, H83, H91, H93, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, V, L, A, T, R, R, E, Q, I, N, A, E, N, L, G, T, F, S, T, và L, như trong hu3D6VHv1e. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H10, H12, H17, H24, H28, H38, H40, H43, H48, H51, H54, H60, H61, H82A, H83, H91, H93, H102, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, V, L, A, T, R, R, Q, I, V, D, A, E, G, T, F, S, Y, T, và L như trong hu3D6VHv1f. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H38 và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và S như trong hu3D6VHv3. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H17, H27, H29, H38, H61, H76, H82A, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, R, E, N, G, và S như trong hu3D6VHv3b. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H17, H27, H28, H29, H30, H38, H51, H54, H60, H61, H76, H82A, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, T, F, T, R, V, D, A, E, N, G, và S như trong hu3D6VHv3c. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H38, H40, H48, H66, H67, H76, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, R, I, K, A, N, L, G, T, và S như trong hu3D6VHv4. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H17, H27, H29, H38, H40, H61, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, Y, F, R, R, E, L, G, T, và S như trong hu3D6VHv4b. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí H12, H17, H27, H28, H29, H30, H38, H40, H51, H54, H60, H61, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, Y, T, F, T, R, R, V, D, A, E, L, G, T, và S như trong hu3D6VHv4c.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L36 bị chiếm bởi L, L37 bị chiếm bởi L, và L100 bị chiếm bởi G. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí L36, L37, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L, và G.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị

chiếm bởi S và L45 bị chiếm bởi K. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí L12 và L45 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S và K.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 là V hoặc I, L7 là S hoặc T, L12 là P hoặc S, L15 là L hoặc I, L36 là L, L37 là L, L45 là R hoặc K, L60 là D hoặc S, L100 là G.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí L12, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, K, và G như trong hu3D6VLv1. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí L36, L37, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L và G như trong hu3D6VLv2. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí L36, L37, L60, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L, S, và G như trong hu3D6VLv3. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí L2, L7, L12, L15, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi I, T, S, I, L, L, K, và G như trong hu3D6VLv4. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, các vị trí L2, L7, L12, L15, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, S, P, L, L, L, R, và G.

Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, chuỗi nặng biến đổi có tỷ lệ đồng nhất với trình tự người ≥ 85%. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ đồng nhất với trình tự người ≥ 85%. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, mỗi chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi có tỷ lệ đồng nhất với trình tự dòng mầm của người ≥ 85% . Trong một số kháng thể 3D6 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 H27 bị chiếm bởi F hoặc Y, H28 bị chiếm bởi N hoặc T, vị trí H29 bị chiếm bởi I hoặc F, vị trí H30 bị chiếm bởi K hoặc T, vị trí H51 bị chiếm bởi I hoặc V, vị trí H54 bị chiếm bởi N hoặc D, vị trí H60 bị chiếm bởi D hoặc A, vị trí H61 bị chiếm bởi P hoặc E, và vị trí H102 bị chiếm bởi F hoặc Y. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H1 Tổ hợp Kabat/Chothia có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO:58, SEQ ID NO:69, hoặc SEQ ID NO:60. Trong một số kháng thể 3D6 được

làm tương thích với người, CDR-H2 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO:61, SEQ ID NO:62, SEQ ID NO:63, hoặc SEQ ID NO:64. Trong một số kháng thể 3D6 được làm tương thích với người, CDR-H3 Kabat có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:65.

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 3D6. Các vùng CDR có thể được xác định bằng định nghĩa quy ước bất kỳ (ví dụ, Chothia, hoặc tổ hợp Chothia và Kabat) nhưng tốt hơn là như được định nghĩa bởi Kabat.

Các vị trí khung vùng biến đổi là theo cách đánh số Kabat trừ khi có quy định khác. Các biến thể khác này thường khác với các trình tự của các chuỗi nặng và nhẹ Hu3D6 được lấy làm ví dụ ở một số lượng nhỏ (*ví dụ*, thường là không nhiều hơn 1, 2, 3, 5, 10, hoặc 15) các đột biến thế, đột biến mất đoạn hoặc đột biến gắn xen. 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 3D6 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 cho đột biến thế. Ngay cả các axit amin trong các CDR có thể được thay đổi, ví dụ, bằng các gốc được phát hiện ở vị trí tương ứng của trình tự nhận của người được sử dụng để cung cấp các khung vùng biến đổi . Ngoài ra, các trình tự nhận của người khác có thể được sử dụng, ví dụ, cho chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Nếu các trình tự nhận khác nhau được sử dụng, một hoặc nhiều trong số các đột biến ngược đã đề cập trên đây có thể không được thực hiện vì các gốc cho và nhận tương ứng đã là giống nhau mà không cần các đột biến ngược.

Tốt hơn, nếu sự thay thế hoặc các đột biến ngược trong các biến thể 3D6 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 3D6 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 3D6 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 3D6 khảm có trình tự axit amin chuỗi nặng của SEQ ID NO: 72 và trình tự axit amin chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:73.

Kháng thể được ngụy trang là một loại kháng thể được làm tương thích với người mà vẫn giữ được một số và thường là toàn bộ các CDR và một số gốc khung vùng biến đổi không phải của người của kháng thể không phải của người nhưng thay thế các gốc khung vùng biến đổi khác mà có thể tham gia vào các epitop tế bào B hoặc T, ví dụ các gốc được bộc lộ (Padlan, *Mol. Immunol.* 28:489, 1991) bằng các gốc từ các vị trí tương ứng của trình tự kháng thể người. Kết quả là một kháng thể trong đó các CDR hoàn toàn hoặc gần như là từ kháng thể không phải của người và các khung vùng biến đổi của kháng thể không phải của người được làm cho giống của người hơn nhờ các đột biến thế này. Các dạng được ngụy trang của kháng thể 3D6 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 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3, lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334 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 một đoạn tau chỉ chứa các gốc axit amin 199-213 hoặc 262-276

của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334 của SEQ ID NO:1) như kháng nguyên đích, và/hoặc bằng cách sàng lọc các kháng thể kháng tập hợp của các biến thể tau, như các biến thể tau chứa nhiều đột biến khác nhau trong các gốc axit amin 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334 của SEQ ID NO:1).

Các phương pháp 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 mang 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 ngụy 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, như trên).

Một hoặc một số axit amin ở các đầu cùng amino hoặc carboxy của chuỗi nhẹ và/hoặc nặng, chẳng hạn như lysin đầu cùng C của chuỗi nặng, có thể bị khuyết hoặc được tạo dẫn xuất ở một phần hoặc toàn bộ phân tử. Các đột biến thế 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 thế 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 đối với vùng hằng định) để làm tăng thời gian bán thải của kháng thể. Đột biến thế ở bất kỳ hoặc toàn bộ các vị trí 234, 235, 236 và/hoặc 237 làm giảm ái lực đối với các thụ thể Fcγ, cụ thể là thụ thể FcγRI (xem, ví dụ, US 6,624,821). Đột biến thế 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 thế alanin ở các vị trí 234, 235 và 237 của IgG1 người để làm giảm chức năng hiệu ứng. Tùy ý, các vị trí 234, 236 và/hoặc 237 ở IgG2 của người được thay thế bằng alanin và vị trí 235 bằng glutamin (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,624,821). Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329, và 331 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 318, 320, và 322 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và/hoặc 235 được thay thế bằng alanin và/hoặc vị trí 329 được thay thế bằng glyxin. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và 235 được thay thế bằng alanin. Trong một số kháng thể, isotyp này là IgG2 hoặc IgG4 người.

Các kháng thể có thể được thể hiện ở dạng các tetrame chứa hai chuỗi nặng và hai chuỗi nhẹ, ở dạng các chuỗi nặng, các chuỗi nhẹ riêng biệt, ở dạng Fab, Fab', F(ab')2, và Fv, hoặc ở dạng các kháng thể mạch đơn trong đó các 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, tức là, các vùng hằng định có thể khác nhau ở các cá thể khác

nhau ở một hoặc nhiều vị trí đa hình. Các isoalotyp khác alotyp ở chỗ huyết thanh nhận diện isoalotyp 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 mồi liên ứng được sử dụng cho peptit dẫn đầu vùng VH chứa codon khởi đầu dịch mã làm đoạn mồi 5' và đoạn mồi 3' đặc hiệu vùng hằng định g2b. Các đoạn mồi 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 mồi 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 mồi liên ứng được thiết kế để khuếch đại các vùng VL bằng cách sử dụng đoạn mồi 5' được thiết kế để lai với vùng VL chứa codon khởi đầu dịch mã và đoạn mồi 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 mồi 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-hγ1 đối với chuỗi nặng và pCMV-Mcl đối với chuỗi nhẹ. Các vectơ này mã hóa các vùng

hằng định γ1 và Ck của người như các đoạn exon xuôi dòng của caset vùng biến đổi đã được gắn xen. Sau khi kiểm tra trình tự, vectơ biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào CHO để tạo ra các kháng thể khảm. Môi trường có điều kiện được thu gom 48 giờ sau chuyển nhiễm và được thử nghiệm bằng phân tích thấm tách tây về khả năng sản sinh kháng thể hoặc bằng ELISA về khả năng liên kết kháng nguyên. Các kháng thể khảm này được làm tương thích với người như được mô tả trên đây.

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

Các vectơ 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 vectơ biểu hiện chứa gen đánh dấu lựa chọn, *ví dụ*, kháng ampixilin hoặc kháng hygromyxin, 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 vectơ 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, adenovirut, 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, phương pháp chuyển nhiễm canxi clorua thường được sử dụng cho các tế bào tiền nhân, trong khi đó phương pháp xử lý canxi phosphat, xung điện, chuyển gen bằng liposom, kỹ thuật bắn gen, hoặc chuyển nhiễm dựa vào virut 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 gộp tế bào có thể được sàng lọc về năng suất phát triển

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

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

Hệ phương pháp để sản xuất thương mại các kháng thể có thể được sử dụng, bao gồm tối ưu hóa codon, chọn lọc trình tự khởi động, chọn lọc các yếu tố phiên mã, chọn lọc gen kết thúc, tách dòng tế bào đơn lẻ không huyết thanh, tạo ngân hàng tế bào, sử dụng các gen đánh dấu lựa chọn để khuếch đại số lượng bản sao, gen kết thúc CHO, hoặc cải thiện hiệu giá protein (*xem, ví dụ*, US 5,786,464; US 6,114,148; US 6,063,598; US 7,569,339; W02004/050884; W02008/012142; W02008/012142; W02005/019442; W02008/107388; W02009/027471; và US 5,888,809).

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 phương pháp gây miễn dịch thụ động trên đây. Các chất được sử dụng để gây miễn dịch chủ động có thể là cùng loại kháng nguyên được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng ở các động vật thí nghiệm, ví dụ, peptit chứa 3-15 hoặc 3-12 hoặc 5-12, hoặc 5-8 axit amin liên tục từ một vùng của tau tương ứng với các gốc 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc 257-271 hoặc 320-334 của SEQ ID NO:1), như, ví dụ, peptit bao gồm các gốc 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc 257-271 hoặc 320-334 của SEQ ID NO:1). Để cảm ứng các kháng thể liên kết với cùng một epitop hoặc epitop gối lên nhau với 3D6, 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 để làm thuốc để sử dụng cho người hơn. Các chất mang thích hợp bao gồm albumin huyết thanh, hemoxyanin của loài ốc keyhole limpet, các phân tử globulin miễn dịch, thyroglobulin, albumin trứng, biến độc tố uốn ván, hoặc biến độc tố từ vi khuẩn gây bệnh khác, như vi khuẩn gây bệnh bạch hầu (*ví dụ*, CRM197), *E. coli,* tả, hoặc *H. pylori*, hoặc dẫn xuất độc tố nhược động. Các epitop tế bào T cũng là các phân tử mang thích hợp. Một số thể liên hợp có thể được tạo ra bằng cách liên kết các chất theo sáng chế với phân tử polyme kích thích miễn dịch (*ví dụ*, tripalmitoyl-S-glyxerin xystein (Pam_3Cys), mannan (polyme mannoza), hoặc glucan (polyme a β 1→2)), xytokin (*ví dụ*, peptit IL-1, IL-1 alpha và β, IL-2, γ-INF, IL-10, GM-CSF), và các chemokin (*ví dụ*, MIP1-α và β, và RANTES). Các kháng nguyên có thể được liên kết với các chất mang có hoặc không có các đoạn axit amin đệm (*ví dụ*, gly-gly). Các chất mang khác bao gồm các hạt tương tự virut. Các hạt tương tự virut (VLP), còn được gọi là virion giả hoặc các hạt thu được từ virut, là các cấu trúc dưới đơn vị chứa nhiều bản sao của protein vỏ capsit và/hoặc protein vỏ ngoài virut 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 dược 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 dược được ưu tiên hơn bao gồm các muối nhôm, như nhôm hydroxit và nhôm phosphat, 3 De-O-axyl hóa monophosphoryl lipit A (MPL™) (xem GB 2220211 (RIBI ImmunoChem Research Inc., Hamilton, Montana, hiện nay là một phần của Corixa). Stimulon™ QS-21 là triterpen glycosit hoặc saponin được phân lập từ vỏ của cây Quillaja Saponaria Molina được tìm thấy ở Nam Mỹ (*xem* Kensil *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 dược khác là các nhũ tương dầu trong nước (như squalen hoặc dầu lạc), tùy ý kết hợp với các chất kích thích miễn dịch, như monophosphoryl lipit A (*xem* Stoute *et al.*, *N. Engl. J. Med.* 336, 86-91 (1997)), các polyme pluronic, và vi khuẩn mycobacterium bị diệt. Các tá dược Ribi là các nhũ tương dầu trong nước. Ribi chứa dầu chuyển hóa được (squalen) được tạo nhũ tương với nước muối chứa Tween 80. Ribi còn chứa các sản phẩm mycobacterium được tinh chế mà có tác dụng làm chất kích thích miễn dịch và monophosphoryl lipit A của vi khuẩn. Một tá dược khác là CpG (WO 98/40100). Các tá dược có thể được sử dụng làm thành phần của dược phẩm cùng với hoạt chất hoặc có thể được sử dụng riêng, trước, đồng thời với, hoặc sau khi sử dụng dược chất.

Các dạng tương tự của các đoạn tự nhiên của 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 cảm ứng đáp ứng miễn dịch tương tự. Các kháng thể kháng idiotyp kháng các kháng thể đơn dòng với tau như được mô tả trên đây cũng có thể được sử dụng. Các kháng thể kháng Id này bắt chước kháng nguyên và tạo ra đáp ứng miễn dịch với nó (xem Essential Immunology, Roit ed., Blackwell Scientific Publications, Palo Alto, CA xuất bản lần 6, trang 181).

Các peptit (và tùy ý chất mang được dung hợp với peptit này) cũng có thể được sử dụng ở dạng axit nucleic mã hóa peptit này và được biểu hiện tại chỗ ở bệnh nhân. Đoạn axit nucleic mã hóa kháng nguyên thường được liên kết với các yếu tố điều hòa, như trình

tự khởi động và trình tự tăng cường mà cho phép biểu hiện đoạn ADN này trong tế bào đích dự kiến của bệnh nhân. Để biểu hiện trong các tế bào máu, như được mong muốn để cảm ứng đáp ứng miễn dịch, trình tự khởi động và yếu tố tăng cường từ các gen globulin miễn dịch chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng hoặc trình tự khởi động sớm trung gian chính CMV và các gen tăng cường là thích hợp để điều khiển sự biểu hiện. Các yếu tố điều hòa được liên kết và các trình tự mã hóa thường được tách dòng vào 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 virut có thể được sử dụng bao gồm các hệ retrovirut (xem, *ví dụ*, Lawrie và Tumin, Cur. Opin. Genet. Develop. 3, 102-109 (1993)); các vectơ adenovirut {xem, *ví dụ*, Bett et al, J. Virol. 67, 591 1 (1993)); vectơ virut liên hợp adeno {xem, *ví dụ*, Zhou et al., J. Exp. Med. 179, 1867 (1994)), các vectơ virut từ họ pox bao gồm các virut vaccinia và virut pox ở chim, các vectơ virut từ giống virut alpha như các vectơ thu được từ Sindbis và Semliki Forest Virut (xem, *ví dụ*, Dubensky et al., J. Virol. 70, 508-519 (1996)), virut gây viêm não ngựa Venezuela (xem US 5,643,576) và rhabdovirut, như virut gây bệnh viêm miệng mụn nước (xem WO 96/34625) và các papillomavirut (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 lipit 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 polymetyl methacrylat 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 như vậy về

khả năng cảm ứng các kháng thể có tính đặc hiệu liên kết này. Trong trường hợp này, kháng nguyên hoạt động được sử dụng để gây miễn dịch động vật thí nghiệm và huyết thanh thu được được kiểm tra về tính đặc hiệu liên kết thích hợp.

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 tốt hơn, nếu là các tế bào nơron. 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 này 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 JNPL3 của chuột. Chuột có gen chuyển tau người với đột biến P301L (đột biến này liên quan đến bệnh sa sút trí tuệ trán thái dương) và trình tự khởi động Thy 1.2 (Taconic, Germantown, N.Y., Lewis, 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 các đám rối thần kinh ít hơn, pSer422 ít hơn, và sự sụt cân được giảm đi so với chuột đối chứng không được điều trị.

Hoạt tính của các kháng thể hoặc hoạt chất có thể được đánh giá bằng nhiều tiêu chuẩn khác nhau bao gồm giảm lượng tau toàn phần hoặc tau được phosphoryl hóa, giảm các đặc điểm bệnh học khác, như các lắng đọng dạng tinh bột của Aβ, và tác dụng ức chế hoặc làm chậm hoặc các khuyết tật hành vi. Các kháng nguyên hoạt động cũng có thể được kiểm tra về khả năng cảm ứng các kháng thể trong huyết thanh. Cả kháng nguyên chủ động và thụ động đều có thể được kiểm tra về sự xâm nhập của kháng thể qua hàng rào máu não vào não của động vật chuyển gen. Các kháng thể hoặc đoạn cảm ứng kháng thể cũng có thể được kiểm tra ở động vật linh trưởng không phải là người mà phát triển các triệu chứng của bệnh được đặc trưng bởi tau một cách tự nhiên hoặc do cảm ứng. Các thử nghiệm trên kháng thể hoặc hoạt chất thường được thực hiện kết hợp với đối chứng, trong đó một thử nghiệm song song được thực hiện ngoại trừ là kháng thể hoặc hoạt chất không có mặt (*ví dụ*, được thay thế bằng tá dược lỏng). Sau đó tác dụng làm giảm, trì hoãn hoặc ức chế các dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh có thể là do kháng thể hoặc hoạt chất được thử nghiệm 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 tiến triển (PSP). Các phác đồ này cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bất kỳ trong số các bệnh này. Do mối liên quan rộng rãi giữa các tình trạng và bệnh thần kinh với tau, các phác đồ hiện nay có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa cho đối tượng bất kỳ thể hiện các mức nồng độ tau hoặc tau được phosphoryl hóa gia tăng (*ví dụ*, trong CSF) so với giá trị trung bình ở các cá thể không bị bệnh thần kinh. Các phác đồ này cũng có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thần kinh ở các cá thể có đột biến ở tau liên quan đến bệnh thần kinh. Các phương pháp này là đặc biệt thích hợp để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh Alzheimer, và cụ thể là ở các bệnh nhân.

Các bệnh nhân thích hợp để điều trị bao gồm các cá thể có nguy cơ bị bệnh nhưng chưa thể hiện các triệu chứng, cũng như các bệnh nhân đang thể hiện các triệu chứng. Các bệnh nhân có nguy cơ mắc bệnh bao gồm các bệnh nhân có nguy cơ mắc bệnh do di truyền đã biết. Các cá thể này bao gồm các đối tượng có họ hàng đã từng mắc bệnh này, và các đối tượng có nguy cơ được xác định bằng cách phân tích các dấu hiệu di truyền hoặc hóa sinh. Các dấu hiệu di truyền về nguy cơ mắc bệnh bao gồm các đột biến ở tau, như các đột biến đã thảo luận trên đây, cũng như các đột biến trong các gen khác liên quan đến bệnh thần kinh. Ví dụ, alen ApoE4 ở dạng dị hợp tử và thậm chí còn hơn như vậy ở dạng đồng hợp tử có liên quan đến nguy cơ mắc bệnh Alzheimer. Các dấu hiệu khác về nguy cơ mắc bệnh Alzheimer bao gồm các đột biến ở gen APP, cụ thể là các đột biến ở vị trí 717 và các vị trí 670 và 671 được gọi lần lượt là các đột biến Hardy và Swedish, các đột biến ở gen presenilin, PS1 và PS2, tiền sử gia đình về AD, bệnh tăng cholesterol huyết hoặc chứng xơ vữa động mạch. Các cá thể đang mắc bệnh Alzheimer có thể được nhận biết bằng cách chụp PET, từ chứng suy giảm nhận thức đặc trưng, cũng như sự có mặt của các yếu tố nguy cơ được mô tả trên đây. Ngoài ra, nhiều xét nghiệm chẩn đoán là sẵn có để xác định các cá thể mắc AD. Các xét nghiệm này bao gồm đo các mức nồng độ tau CSF hoặc phospho-tau và Aβ42. Các mức nồng độ tau hoặc phospho-tau gia tăng và mức Aβ42 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 theo tiêu chuẩn của DSM IV TR.

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

Các axit nucleic

Sáng chế đề xuất thêm các axit nucleic mã hóa bất kỳ trong số các chuỗi nặng và nhẹ được mô tả trên đây (*ví dụ*, SEQ ID NO: 7, 11, 15-19, và SEQ ID NO: 20-23, SEQ ID NO: 46-57, và SEQ ID NO:66). 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 vectơ. Các axit nucleic này có thể được tổng hợp bằng, ví dụ, phương pháp tổng hợp trạng thái rắn hoặc PCR của các oligonucleotit gối 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 vectơ biểu hiện, hoặc có thể là riêng biệt, ví dụ, mỗi axit nucleic được tách dòng vào vectơ 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 ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) ở bệnh nhân. Ví dụ, các kháng thể này có thể được liên hợp với các gốc điều trị khác, các protein khác, các kháng thể khác, và/hoặc các nhãn phát hiện được. *Xem* WO 03/057838; US 8,455,622. Các gốc điều trị này có thể là hợp chất bất kỳ mà có thể được sử dụng để điều trị, chống, cải thiện, phòng ngừa, hoặc cải thiện bệnh hoặc tình trạng không mong muốn ở bệnh nhân, như bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, 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).

Các gốc điều trị được liên hợp có thể bao gồm các chất gây độc tế bào, chất kìm 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 kìm 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 nơron, sự sinh trưởng hoặc biệt hóa nơron. Chất bảo vệ thần kinh có thể là chất, bao gồm các chất hóa học hoặc chứa protein, mà bảo vệ các nơron 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-axetylmercaptosucxinic anhydrit cho kháng thể này và sucxinimidyl 3-(2-pyridyldithio)propionat cho ricin. *Xem* Pietersz *et al., Cancer Res.* 48(16):4469-4476 (1998). Sự kết hợp này dẫn đến sự mất hoạt tính liên kết chuỗi B của ricin, trong khi không làm suy yếu khả năng gây độc của chuỗi A của ricin cũng như tác dụng của kháng thể này. Tương tự, saporin, chất ức chế cấu trúc ribosom, có thể được ghép với các kháng thể nhờ liên kết disulfua giữa các nhóm sulfhydryl được gắn xen hóa học. *Xem* Polito *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, yttri^{90} (90Y), indi^{111} (111In), ^{131}I, ^{99}mTc, bạc phóng xạ-111, bạc phóng xạ-199, và Bismut^{213}. 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 liên quan đến phản ứng khử globulin miễn dịch bằng axit ascorbic. Đối với các đồng vị phóng xạ như 111In và 90Y, ibritumomab tiuxetan có thể được sử dụng và sẽ phản ứng với các chất đồng vị này để lần lượt tạo ra 111In-ibritumomab tiuxetan và 90Y-ibritumomab tiuxetan. *Xem* Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

Một số kháng thể này có thể được liên kết với các gốc điều trị khác. Các gốc điều trị này có thể, ví dụ, gây độc tế bào, kìm tế bào, dinh dưỡng thần kinh, hoặc bảo vệ thần kinh. Ví dụ, các kháng thể có thể được liên hợp với các dược chất hóa trị liệu gây độc như maytansine, geldanamycin, chất ức chế tubulin như chất liên kết tubulin (*ví dụ*, auristatin), hoặc chất liên kết rãnh nhỏ như calicheamicin. Các gốc điều trị điển hình khác bao gồm các chất đã biết là hữu ích để điều trị, quản lý, hoặc cải thiện bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, 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).

Các kháng thể cũng có thể được kết hợp với các protein khác. Ví dụ, các kháng thể có thể được kết hợp với các Fynomer. Fynomer là các protein liên kết nhỏ (*ví dụ*, 7 kDa) thu được từ vùng chức năng Fyn SH3 của người. Chúng có thể ổn định và hòa tan được, và chúng có thể thiếu các gốc xystein và các liên kết disulfua. Fynomer có thể được thao tác di truyền để liên kết với các phân tử đích với cùng ái lực và tính đặc hiệu với các kháng thể. Chúng là thích hợp để tạo ra các protein dung hợp đa đặc hiệu dựa trên các kháng thể. Ví dụ, Fynomer có thể được dung hợp với đầu cùng N và/hoặc đầu cùng C của các kháng thể để tạo ra FynomAb đặc hiệu kép và đặc hiệu ba với các cấu trúc khác nhau. Các Fynomer có thể được lựa chọn bằng cách sử dụng các thư viện Fynomer nhờ các công nghệ sàng lọc sử dụng các thử nghiệm FACS, Biacore, và thử nghiệm dựa trên tế bào cho phép lựa chọn hiệu quả Fynomer có các đặc điểm tối ưu. Các ví dụ về Fynomer được mô tả trong Grabulovski *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); và 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 ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP), và/hoặc để đánh giá tác dụng điều trị. Các kháng thể này là đặc biệt hữu ích để thực hiện các kỹ thuật xác định như vậy ở đối tượng mắc hoặc dễ bị mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, 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), 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, Bismuth^{213}, iot (^{131}I, ^{125}I, ^{123}I, ^{121}I,), cacbon (^{14}C), lưu huỳnh (^{5}S), triti (^{3}H), indi (^{115}In, ^{113}In, ^{112}In, ^{111}In,), tecneti (^{99}Tc), tali (^{201}Ti), gali (^{68}Ga, ^{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}Tin; 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 liên quan đến phản ứng khử globulin miễn dịch bằng axit ascorbic. Đối với các đồng vị phóng xạ như 111In và 90Y, ibritumomab tiuxetan có thể được sử dụng và sẽ phản ứng với các chất đồng vị này để lần lượt tạo ra 111In-ibritumomab tiuxetan và 90Y-ibritumomab tiuxetan. *Xem* Witzig, *Cancer Chemother. Pharmacol.*, 48 Suppl 1:S91-S95 (2001).

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 (2nd Ed.), 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 sự tạo thành tau hoặc phospho-tau và các sợi tạo cặp được tạo thành từ nó trong não, và hoặc ức chế hoặc làm chậm tác dụng gây độc của nó và/hoặc ức chế/hoặc làm chậm sự phát triển của tình trạng khuyết tật hành vi. Trong các ứng dụng điều trị, kháng thể hoặc chất cảm ứng kháng thể được sử dụng cho bệnh nhân bị nghi ngờ, hoặc đã mắc bệnh (*ví dụ*, bệnh Alzheimer) theo phác đồ (liều, tần số và đường sử dụng) hữu hiệu để cải thiện hoặc ít nhất là ức chế sự hủy hoại thêm của ít nhất là một dấu hiệu hoặc triệu chứng của bệnh này. Cụ thể là, tốt hơn, nếu phác đồ này là hữu hiệu để làm giảm hoặc ít nhất là ức chế sự tăng thêm các mức nồng độ tau, phospho-tau, hoặc các sợi được tạo cặp được tạo ra từ nó, các tác dụng gây độc có liên quan và/hoặc tình trạng khuyết tật hành vi.

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

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

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

điều trị được lấy làm ví dụ khác đòi hỏi sử dụng hai tuần một lần hoặc một tháng một lần hoặc 3 đến 6 tháng một lần.

Lượng hoạt chất để sử dụng chủ động thay đổi từ 0,1-500 μg trên mỗi bệnh nhân và thường xuyên hơn là từ 1-100 hoặc 1-10 μg mỗi lần tiêm để sử dụng cho người. Thời gian tiêm có thể thay đổi đáng kể từ một lần mỗi ngày, đến một lần một năm, đến một lần trong mười năm. Phác đồ điển hình bao gồm gây miễn dịch sau đó tiêm liều tăng cường 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 lặp lại đều đặn như được chỉ ra bằng cách theo dõi đáp ứng miễn dịch.

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

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

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

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

Các kháng thể được sử dụng trong phác đồ hữu hiệu có nghĩa là liều, đường sử dụng và tần số sử dụng mà trì hoãn sự phát bệnh, làm giảm mức độ nghiêm trọng, ức chế sự hủy hoại thêm nữa, và/hoặc cải thiện ít nhất là một dấu hiệu hoặc triệu chứng của rối loạn đang được điều trị. Nếu bệnh nhân đã mắc sẵn một rối loạn, phác đồ này có thể được gọi là phác đồ hữu hiệu để điều trị. Nếu bệnh nhân có nguy cơ cao mắc rối loạn này so với nhóm 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 theo 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 nhóm các bệnh nhân được điều trị so với nhóm đối chứng gồm các bệnh nhân không được điều trị.

Liều được lấy làm ví dụ cho kháng thể là 0,1-60 mg/kg (ví dụ, 0.5, 3, 10, 30, hoặc 60 mg/kg), hoặc 0,5-5 mg/kg thể trọng (ví dụ, 0,5, 1, 2, 3, 4 hoặc 5 mg/kg) hoặc 10-4000 mg hoặc 10-1500 mg làm liều cố định. Liều này phụ thuộc vào tình trạng của bệnh nhân và đáp ứng với điều trị trước đó, nếu có, dù phương pháp điều trị này là phòng ngừa hay chữa bệnh và dù rối loạn này là cấp tính hay mãn tính, trong số các yếu tố khác.

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

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

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

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 3D6 của chuột, được làm tương thích với người, khảm hoặc ngụy trang), cho bệnh nhân và sau đó phát hiện chất này sau khi nó được liên kết. Các kháng thể liên kết với epitop của tau trong các gốc axit amin 199-213 hoặc 262-276 của SEQ ID NO:3 (lần lượt tương ứng với các gốc axit amin 257-271 hoặc 320-334 của SEQ ID NO:1) được ưu tiên hơn. Trong một số phương pháp, kháng thể này liên kết với epitop trong các gốc axit amin 199-213 của SEQ ID NO:3 (tương ứng với các gốc axit amin 257-271 của SEQ ID NO:1), hoặc trong các gốc axit amin 262-276 của SEQ ID NO:3 (tương ứng với các gốc axit amin 320-334 của SEQ ID NO:1). Phản ứng đào thải đối với các kháng thể đã sử dụng có thể

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

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

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

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

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

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

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

Trong một số phương pháp, kỹ thuật quét PET được thực hiện đồng thời với hoặc trong cùng một lần khám của bệnh nhân với kỹ thuật quét MRI hoặc CAT. Kỹ thuật quét MRI hoặc CAT cung cấp giải phẫu chi tiết hơn về bộ não so với kỹ thuật quét PET. Tuy nhiên, hình ảnh từ kỹ thuật quét PET có thể được chồng lên hình ảnh quét MRI hoặc CAT chỉ ra 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 các vị trí giữa các lần quét tạo thuận lợi cho việc chồng các hình ảnh.

Các phối tử PET thích hợp bao gồm các kháng thể được đánh dấu phóng xạ theo sáng chế (*ví dụ*, kháng thể 3D6 của chuột, được làm tương thích với người, khảm hoặc

được ngụy 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 thảo của nó trong não, và thời gian bán thải của nhãn phóng xạ .

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

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

Các mức lắng đọng protein tau bình thường có thể được xác định bằng lượng đám rối thần kinh hoặc thể vùi tau trong não của mẫu đại diện của các cá thể trong 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 để bắt đầu liệu pháp miễn dịch.

Sau khi bắt đầu liệu pháp miễn dịch, sự giảm mức lắng đọng protein tau có thể được 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 được 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 tỷ lệ phần trăm giảm so với đường cơ sở với sự tăng các lắng đọng protein tau mà nếu không sẽ xảy ra ở bệnh nhân không được điều trị trung bình.

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

Việc theo dõi các thay đổi ở các lắng đọng protein tau cho phép điều chỉnh liệu pháp miễn dịch hoặc phác đồ điều trị khác đáp ứng với việc điều trị này. Việc theo dõi bằng PET cung cấp chỉ báo về bản chất và mức độ của đáp ứng với phương pháp điều trị. Sau đó có thể quyết định có điều chỉnh phương pháp điều trị hay không và nếu muốn, phương pháp điều trị có thể được điều chỉnh 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 đáp ứng 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 phượng sai của độ lệch chuẩn) cũng có thể cung cấp bằng chứng là phác đồ liệu pháp miễn dịch này đang đạt được hoặc không đạt được tác dụng có lợi ở bệnh nhân.

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

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

Ở các bệnh nhân khác, việc theo dõi có thể chỉ ra là liệu pháp miễn dịch đang có một số tác dụng có lợi nhưng là tác dụng dưới mức tối ưu. Tác dụng tối ưu có thể được

xác định là tỷ lệ phần trăm giảm mức lắng đọng protein tau 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 đã cho 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 đã được tập trung nhiều vào việc sử dụng kỹ thuật quét PET. Tuy nhiên, kỹ thuật khác bất kỳ để quan sát và/hoặc đo các lắng đọng protein tau mà thích hợp với việc sử dụng các kháng thể tau theo sáng chế (*ví dụ*, kháng thể 3D6 của chuột, được làm tương thích với người, khảm hoặc được ngụy trang) có thể được sử dụng thay cho kỹ thuật quét PET để thực hiện các phương pháp này.

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

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

[0001] 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 ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP).

Các mẫu sinh học thu được từ đối tượng mắc, bị nghi ngờ mắc, hoặc nguy cơ mắc bệnh Alzheimer, hội chứng Down, suy giảm nhận thức nhẹ, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi nguyên phát, 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 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 dùng để chỉ hướng dẫn thường nằm trong các gói thương mại của dược phẩm mà chứa thông tin về các chỉ định, cách sử dụng, liều, đường sử dụng, chống chỉ định và/hoặc các khuyến cáo liên quan đến việc sử dụng các dược phẩm này.

Kit có thể còn bao gồm đồ bao gói thứ hai chứa dung dịch đệm dược dụng, như nước kìm khuẩn dùng để tiêm (BWFI), nước muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer

và dung dịch dextroza. Nó cũng có thể chứa các nguyên liệu khác được mong muốn theo quan điểm thương mại và bởi người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm khác, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm và xylanh.

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 này và mẫu sinh học này có thể chứa các tế bào có cùng nguồn gốc mô. Các mẫu đối chứng và các mẫu sinh học có thể thu được từ cùng một cá thể hoặc nhiều cá thể khác nhau và tại cùng một thời điểm hoặc vào nhiều thời điểm khác nhau. Nếu muốn, nhiều mẫu sinh học và nhiều mẫu đối chứng được đánh giá vào nhiều thời điểm để bảo vệ chống lại sự biến đổi ngẫu nhiên không phụ thuộc vào các sự khác biệt giữa các mẫu này. Sau đó so sánh trực tiếp có thể được thực hiện giữa (các) mẫu sinh học và (các) mẫu đối chứng này để xác định sự 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 ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh

Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP) ở bệnh nhân. Sự giảm 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 ưa bạc, bệnh do tau thần kinh đệm hình cầu, phức hợp bệnh xơ cứng teo cơ một bên/bệnh sa sút trí tuệ do parkinson của Guam, bệnh thoái hóa vỏ não và hạch nền (CBD), chứng sa sút trí tuệ với các thể Lewy, biến thể thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), hoặc bệnh liệt trên nhân tiến triển (PSP).

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

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

Chuột Balb/c cái năm tuần tuổi được gây miễn dịch trong màng bụng bằng 25µg kháng nguyên A vào ngày 0, và 10µg kháng nguyên A vào mỗi ngày 7, 14, 21, 27, 34, 48, 55, và 62. Chuột được gây miễn dịch bằng 10µg kháng nguyên B vào các ngày 76 và 90. Vào các ngày 43 và 98, chuột được lấy máu và được đo hiệu giá kháng kháng nguyên A; vào ngày 101 các động vật có hiệu giá cao nhất được tăng cường với liều gây miễn dịch cuối cùng là 50µg kháng nguyên B, được phân phối ½ trong màng bụng và ½ trong tĩnh mạch. Các tế bào lai đã dung hợp được sàng lọc bằng ELISA dựa trên cả hai kháng nguyên, và các tế bào dương tính với tín hiệu cao nhất được lập bản đồ epitop (xem Ví dụ 2). 3D6 phản ứng với các peptit tương ứng với các gốc axit amin 199-213 của SEQ ID NO:3 và với các gốc axit amin 262-276 của SEQ ID NO:3 (theo cách đánh số đồng dạng CNS dài nhất của tau, đồng dạng này tương ứng với các gốc axit amin 257-271 của SEQ ID NO:1 và với các gốc axit amin 320-334 của SEQ ID NO:1).

Ví dụ 2. Lập bản đồ epitop của kháng thể 3D6

Khoảng gồm các peptit được biotinyl hóa gối lên nhau kéo dài toàn bộ protein tau người 383aa 4R0N được sử dụng để lập bản đồ kháng thể 3D6 của chuột. Các peptit bổ sung được sử dụng để tạo mô hình các biến đổi sau dịch mã tiềm tàng của các đầu cùng C và N của protein này.

Các peptit được biotinyl hóa được liên kết với các giếng riêng biệt của đĩa ELISA được phủ streptavidin. Các đĩa được phong bế và được xử lý bằng 3D6 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 199-213 (của SEQ ID NO:3), và các gốc axit amin 262-276 (của SEQ ID NO:3) kéo dài peptit. Bằng cách sử dụng cách đánh số protein tau người 4R2N có độ dài đầy đủ (441 axit amin) các peptit này tương ứng với các gốc axit amin 257-271 (của SEQ ID NO:1) và 320-334 (của SEQ ID NO:1). (Fig.1)

Ví dụ 3. Thiết kế các kháng thể 3D6 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu hoặc kháng thể cho để làm tương thích với người là kháng thể chuột 3D6. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của m3D6 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO:7. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của m3D6 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.

Kapa biến đổi (Vk) của 3D6 thuộc phân nhóm 2 Kabat chuột mà tương ứng với phân nhóm 2 Kabat người và chuỗi nặng biến đổi (Vh) thuộc phân nhóm 2c Kabat chuột mà tương ứng với phân nhóm 1 Kabat người [Kabat E.A., et al., (1991), Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition. NIH Publication No. 91-3242]. CDR-L1 Chothia 16 gốc thuộc lớp chính tắc 4, 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. [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H1 Chothia 10 gốc thuộc lớp 1, CDR-H2 Chothia 17 gốc thuộc lớp 2 [Martin & Thornton, 1996]. CDR-H3 không có các lớp chính tắc. Việc tra cứu được thực hiện trên các trình tự protein trong cơ sở dữ liệu PDB (Deshpande N, et al., (2005) Nucleic Acids Res. 33: D233-7.] để tìm ra các cấu trúc sẽ cung cấp mô hình cấu trúc thô của 3D6. Để xây dựng mô hình Fv của 3D6, cấu trúc của kháng thể liên kết với epitop tham gia vào sự thay đổi cấu hình PrPC thành PrPSc (mã pdb 1CR9; SEQ ID NO: 70) [Kanyo, Z.F., et al. (1999). J.Mol..Biol. 293: 855-863] có độ phân giải 2,0A được sử dụng. Nó giữ lại cấu trúc chính tắc cho các vòng này giống như 3D6. 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)], việc tra 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. Đối với Vk, chuỗi nhẹ kapa người với IMGT#IGKV2-30*02 (trình tự VH dòng mầm người) và IMGT#IGKJ2*01 (trình tự VJ dòng mầm người) được lựa chọn. IMGT#IGKV2-30*02 có cùng các lớp chính tắc cho CDR-L1, CDR-L2 và L3 với 3D6 chuột. IMGT#IGKV2-30*02 và IMGT#IGKJ2*01 thuộc phân nhóm 2 kapa người. Trình tự nhận VL người AAZ09048.1 cũng được sử dụng. Đối với Vh, chuỗi nặng người với IMGT# IGHV1-69-2*01 (trình tự VH dòng mầm người) và IMGT#IGKJ1*01 (trình tự VJ dòng mầm người) được chọn, cả hai đều thuộc phân nhóm 1 chuỗi nặng người. IMGT# IGHV1-69-2*01 có chung dạng chính tắc của CDR-H1 và H2 3D6 của chuột. Đối với thiết kế 1 và 2 của VH, trình tự nhận VH người BAC01986.1 từ bước tra cứu 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 đó).

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)], việc tra 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. 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.

17 biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và 4 biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa nhiều hoán vị khác nhau của các đột biến thế hu3D6VHv1 (SEQ ID NO:15); hu3D6VHv2 (SEQ ID NO:16);, hu3D6VHv1b (SEQ ID NO:17); hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO:18); hu3D6VHv5 (SEQ ID NO:19); hu3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO:46); hu3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO:47); hu3D6VHv1c (SEQ ID NO:48); hu3D6VHv1d (SEQ ID NO:49); hu3D6VHv1e (SEQ ID NO:50); hu3D6VHv1f (SEQ ID

NO:51); hu3D6VHv3 (SEQ ID NO:52); hu3D6VHv3b (SEQ ID NO:53); hu3D6VHv3c (SEQ ID NO:54); hu3D6VHv4 (SEQ ID NO:55); hu3D6VHv4b (SEQ ID NO:56); và hu3D6VHv4c (SEQ ID NO:57); và hu3D6VLv1, hu3D6VLv2, hu3D6VLv3, và hu3D6VLv4 (SEQ ID NO:20-23, tương ứng) (Bảng 3 và 4). Các thiết kế Vk và Vh được làm tương thích với người điển hình, có các đột biến ngược và các đột biến khác dựa trên các khung người đã chọn, được thể hiện trong các Bảng 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: 15-19, SEQ ID NO: 20-23, SEQ ID NO: 46-57 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong Bảng 5. Các axit amin ở các vị trí trong hu3D6VHv1, hu3D6VHv2, hu3D6VHv1b, hu3D6VHv1bA11, hu3D6VHv5, hu3D6VHv1bA11B6G2, hu3D6VHv1bA11B6H3, hu3D6VHv1c, hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1e, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3, hu3D6VHv3b, hu3D6VHv3c, hu3D6VHv4, hu3D6VHv4b, và hu3D6VHv4c được liệt kê trong Bảng 6. Các axit amin ở các vị trí trong hu3D6VLv1, hu3D6VLv2, hu3D6VLv3, và hu3D6VLv4 được liệt kê trong Bảng 7. Tỷ lệ phần trăm tính chất người đối với các chuỗi VH được làm tương thích với người hu3D6VHv1, hu3D6VHv2, hu3D6VHv1b, hu3D6VHv1bA11, hu3D6VHv5, hu3D6VHv1bA11B6G2, hu3D6VHv1bA11B6H3, hu3D6VHv1c, hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1e, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3, hu3D6VHv3b, hu3D6VHv3c, hu3D6VHv4, hu3D6VHv4b, và hu3D6VHv4c (SEQ ID NO: 15-19, 46-57 tương ứng) và các chuỗi VL được làm tương thích với người hu3D6VLv1, hu3D6VLv2, hu3D6VLv3, và hu3D6VLv4 (SEQ ID NO:20-23, tương ứng) được thể hiện trong Bảng 8.

Bảng 3

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
1	1	Fr1	E	E		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	Fr1	V	V		V	V	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	Q	Q	Q	Q
4	4	Fr1	L	L		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	Fr1	Q	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
6	6	Fr1	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	Fr1	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	Fr1	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
10	10	Fr1	D	E		E	E	E	E	E	E	E	E	E	D	D	E	E	E	E	E	E	E
11	11	Fr1	L	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
12	12	Fr1	V	K		V	K	V	V	V	V	V	K	K	V	V	K	K	K	V	V	V	V
13	13	Fr1	R	K		R	K	R	K	K	K	K	R	R	K	K	K	K	K	K	K	K	K
14	14	Fr1	P	P		P	P	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	G	G	G	G

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
16	16	Fr1	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
17	17	Fr1	L	T		L	S	L	T	T	T	T	L	L	L	L	T	L	L	T	L	L	
18	18	Fr1	V	V		V	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	K	K	K	
20	20	Fr1	L	I		V	V	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	
21	21	Fr1	S	S		S	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	C	C	C	
23	23	Fr1	K	K		K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	
24	24	Fr1	A	V		A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V	V	V	V	
25	25	Fr1	S	S		S	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	G	G	G	
27	27	Fr1	F	Y		F	F	F	F	F	F	F	F	Y	F	F	F	Y	Y	F	Y	Y	
28	28	Fr1	N	T		N	N	N	N	T	T	T	N	T	T	T	N	N	T	N	N	T	
29	29	Fr1	I	F		I	I	I	I	I	I	I	F	F	I	I	I	F	F	I	F	F	
30	30	Fr1	K	T		K	K	K	K	K	K	K	K	T	K	K	K	K	T	K	K	T	
31	31	CDR-	D	D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
		H1																					
32	32	CDR-H1	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	CDR-H1	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
34	34	CDR-H1	L	M		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
35	35	CDR-H1	H	H		H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H	H
35A		CDR-H1																					
35B		CDR-H1																					

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
36	36	Fr2	W	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	Fr2	V	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	Fr2	R	Q		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
39	39	Fr2	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	Fr2	R	A		A	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	A	A	R	R	R
41	41	Fr2	P	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	Fr2	E	G		E	E	E	G	G	G	G	E	E	E	G	G	G	G	G	G	G	G
43	43	Fr2	Q	K		Q	Q	Q	Q	Q	K	K	Q	Q	Q	Q	K	K	K	K	K	K	K
44	44	Fr2	G	G		G	G	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	L	L	L	L
46	46	Fr2	E	E		E	E	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	W	W	W	W
48	48	Fr2	I	M		I	M	I	I	I	I	I	M	M	I	I	M	M	M	I	M	M	M
49	49	Fr2	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
50	50	CDR-H2	W	L		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
51	51	CDR-H2	I	V		I	I	I	I	I	V	I	I	V	I	V	I	I	V	I	I	V
52	52	CDR-H2	D	D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
52A	53	CDR-H2	P	P		P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
52B																							
52C																							
53	54	CDR-H2	E	E		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
54	55	CDR-H2	N	D		N	N	N	N	D	D	D	N	D	N	D	N	N	N	D	N	N	D
55	56	CDR-	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G

Góc Kabat #	Góc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
		H2																					
56	57	CDR-H2	D	E		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
57	58	CDR-H2	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	59	CDR-H2	V	I		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
59	60	CDR-H2	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	61	CDR-H2	D	A		D	D	D	D	A	A	A	D	A	A	A	D	D	A	D	D	A	
61	62	CDR-H2	P	E		P	P	P	P	P	P	P	E	E	E	E	P	E	E	P	E	E	

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
62	63	Fr3	K	K		K	K	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	F	F	F	F
64	65	Fr3	Q	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
65	66	Fr3	G	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	67	Fr3	K	R		K	R	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K	R	R
67	68	Fr3	A	V		A	V	A	A	A	A	A	A	V	V	V	V	V	V	V	A	V	V
68	69	Fr3	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	70	Fr3	I	I		I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
70	71	Fr3	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
71	72	Fr3	A	A		A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
72	73	Fr3	D	D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	74	Fr3	T	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
74	75	Fr3	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
75	76	Fr3	S	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
76	77	Fr3	N	D		N	N	N	D	D	D	D	N	N	N	D	D	N	N	N	D	D	
77	78	Fr3	T	T		T	T	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	A	A	A	A

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
79	80	Fr3	Y	Y		Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	81	Fr3	L	M		L	M	L	L	L	L	L	L	L	L	L	M	M	M	M	L	L	L
81	82	Fr3	Q	E		Q	E	Q	Q	Q	E	E	Q	Q	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	L	L	L	L
82A	84	Fr3	G	S		S	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	S	G	G	G	G	G
82B	85	Fr3	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
82C	86	Fr3	L	L		L	L	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	T	R	R	R	T	T	T
84	88	Fr3	S	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
85	89	Fr3	E	E		E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	90	Fr3	D	D		D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	91	Fr3	T	T		T	T	T	T	T	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	A	A	A	A
89	93	Fr3	V	V		V	V	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	Y	Y	Y	Y
91	95	Fr3	F	Y		F	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	96	Fr3	C	C	A	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR																				
		3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)																				
		Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)																				
		Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)																				
		h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)																				
		h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)																				
		h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)																				
		h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)																				
		h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)																				
		h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)																				
		h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)																				
		h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)																				
		h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)																				
		h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)																				
		h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)																				
		h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)																				
		h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)																				
		h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)																				
		h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)																				
		h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)																				
		h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)																				
93	97	Fr3	S	A	E	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
94	98	CDR-H3	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
95	99	CDR-H3	L		F	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
96		CDR-H3																				
97		CDR-H3																				
98		CDR-H3																				
99		CDR-H3																				

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
100		CDR-H3																					
100A																							
100B																							
100C																							
100D																							
100E																							
100F																							
100G																							
100H																							
100I																							
100J																							
100K																							
101	100	CDR-H3	D		Q	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VH chuột (SEQ ID NO: 7)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ ID NO: 25)	Trình tự nhận Hu VH FR Acc. # IMGT# IGHJ1*01 (SEQ ID NO: 26)	h3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	h3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	h3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17)	h3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18)	h3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19)	h3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO: 46)	h3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO: 47)	h3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48)	h3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49)	h3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50)	h3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51)	h3D6VHv3 (SEQ ID NO: 52)	h3D6VHv3b (SEQ ID NO: 53)	h3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54)	h3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55)	h3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56)	h3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57)
102	101	CDR-H3	F		H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	Y	F	F	F	F	F	F
103	102	Fr4	W		W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	103	Fr4	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	104	Fr4	Q		Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	105	Fr4	G		G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	106	Fr4	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	107	Fr4	T		L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	T	T	L	L	L	L	L
109	108	Fr4	L		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	L	L	V	V	V	V	V
110	109	Fr4	T		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	110	Fr4	V		V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	111	Fr4	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	112	Fr4	S		S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

Bảng 4

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VL chuột (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 28)	hu3D6VLv1 (SEQ ID NO: 20)	hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21)	hu3D6VLv3 (SEQ ID NO: 22)	hu3D6VLv4 (SEQ ID NO: 23)
1	1	Fr1	D	D		D	D	D	D
2	2	Fr1	V	V		V	V	V	I
3	3	Fr1	V	V		V	V	V	V
4	4	Fr1	M	M		M	M	M	M
5	5	Fr1	T	T		T	T	T	T
6	6	Fr1	Q	Q		Q	Q	Q	Q
7	7	Fr1	T	S		S	S	S	T
8	8	Fr1	P	P		P	P	P	P
9	9	Fr1	L	L		L	L	L	L
10	10	Fr1	T	S		S	S	S	S
11	11	Fr1	L	L		L	L	L	L
12	12	Fr1	S	P		S	P	P	S
13	13	Fr1	V	V		V	V	V	V
14	14	Fr1	T	T		T	T	T	T
15	15	Fr1	I	L		L	L	L	I
16	16	Fr1	G	G		G	G	G	G
17	17	Fr1	Q	Q		Q	Q	Q	Q
18	18	Fr1	P	P		P	P	P	P
19	19	Fr1	A	A		A	A	A	A
20	20	Fr1	S	S		S	S	S	S
21	21	Fr1	I	I		I	I	I	I
22	22	Fr1	S	S		S	S	S	S
23	23	Fr1	C	C		C	C	C	C
24	24	CDR-L1	K	R		K	K	K	K
25	25	CDR-L1	S	S		S	S	S	S
26	26	CDR-L1	S	S		S	S	S	S
27	27	CDR-L1	Q	Q		Q	Q	Q	Q
27A	28	CDR-L1	S	S		S	S	S	S
27B	29	CDR-L1	L	L		L	L	L	L
27C	30	CDR-L1	L	V		L	L	L	L
27D	31	CDR-L1	D	H		D	D	D	D
27E	32	CDR-L1	S	S		S	S	S	S
27F		CDR-L1							

Bảng 4

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VL chuột (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 28)	hu3D6VLv1 (SEQ ID NO: 20)	hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21)	hu3D6VLv3 (SEQ ID NO: 22)	hu3D6VLv4 (SEQ ID NO: 23)
28	33	CDR-L1	D	D		D	D	D	D
29	34	CDR-L1	G	G		G	G	G	G
30	35	CDR-L1	K	N		K	K	K	K
31	36	CDR-L1	T	T		T	T	T	T
32	37	CDR-L1	Y	Y		Y	Y	Y	Y
33	38	CDR-L1	L	L		L	L	L	L
34	39	CDR-L1	N	N		N	N	N	N
35	40	Fr2	W	W		W	W	W	W
36	41	Fr2	L	F		L	L	L	L
37	42	Fr2	L	Q		L	L	L	L
38	43	Fr2	Q	Q		Q	Q	Q	Q
39	44	Fr2	R	R		R	R	R	K
40	45	Fr2	P	P		P	P	P	P
41	46	Fr2	G	G		G	G	G	G
42	47	Fr2	Q	Q		Q	Q	Q	Q
43	48	Fr2	S	S		S	S	S	S
44	49	Fr2	P	P		P	P	P	P
45	50	Fr2	K	R		K	R	R	K
46	51	Fr2	R	R		R	R	R	R
47	52	Fr2	L	L		L	L	L	L
48	53	Fr2	I	I		I	I	I	I
49	54	Fr2	Y	Y		Y	Y	Y	Y
50	55	CDR-L2	L	K		L	L	L	L
51	56	CDR-L2	V	V		V	V	V	V
52	57	CDR-L2	S	S		S	S	S	S
53	58	CDR-L2	K	N		K	K	K	K
54	59	CDR-L2	L	R		L	L	L	L
55	60	CDR-L2	D	D		D	D	D	D
56	61	CDR-L2	S	S		S	S	S	S
57	62	Fr3	G	G		G	G	G	G
58	63	Fr3	V	V		V	V	V	V
59	64	Fr3	P	P		P	P	P	P
60	65	Fr3	D	D		D	D	S	D

Bảng 4

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VL chuột (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 28)	hu3D6VLv1 (SEQ ID NO: 20)	hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21)	hu3D6VLv3 (SEQ ID NO: 22)	hu3D6VLv4 (SEQ ID NO: 23)
61	66	Fr3	R	R		R	R	R	R
62	67	Fr3	F	F		F	F	F	F
63	68	Fr3	T	S		S	S	S	S
64	69	Fr3	G	G		G	G	G	G
65	70	Fr3	S	S		S	S	S	S
66	71	Fr3	G	G		G	G	G	G
67	72	Fr3	S	S		S	S	S	S
68	73	Fr3	G	G		G	G	G	G
69	74	Fr3	T	T		T	T	T	T
70	75	Fr3	D	D		D	D	D	D
71	76	Fr3	F	F		F	F	F	F
72	77	Fr3	T	T		T	T	T	T
73	78	Fr3	L	L		L	L	L	L
74	89	Fr3	K	K		K	K	K	K
75	80	Fr3	I	I		I	I	I	I
76	81	Fr3	S	S		S	S	S	S
77	82	Fr3	R	R		R	R	R	R
78	83	Fr3	V	V		V	V	V	V
79	84	Fr3	E	E		E	E	E	E
80	85	Fr3	A	A		A	A	A	A
81	86	Fr3	E	E		E	E	E	E
82	87	Fr3	D	D		D	D	D	D
83	88	Fr3	L	V		V	V	V	V
84	89	Fr3	G	G		G	G	G	G
85	90	Fr3	V	V		V	V	V	V
86	91	Fr3	Y	Y		Y	Y	Y	Y
87	92	Fr3	Y	Y		Y	Y	Y	Y
88	93	Fr3	C	C		C	C	C	C
89	94	CDR-L3	W	M		W	W	W	W
90	95	CDR-L3	Q	Q		Q	Q	Q	Q
91	96	CDR-L3	G	G		G	G	G	G
92	97	CDR-L3	T	T		T	T	T	T
93	98	CDR-L3	H	H		H	H	H	H

Bảng 4

Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	3D6 VL chuột (SEQ ID NO: 11)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ ID NO: 27)	Trình tự nhận Hu VL Fr Acc. # IMGT#IGKJ2*01 (SEQ ID NO: 28)	hu3D6VLv1 (SEQ ID NO: 20)	hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21)	hu3D6VLv3 (SEQ ID NO: 22)	hu3D6VLv4 (SEQ ID NO: 23)
94	99	CDR-L3	F	W		F	F	F	F
95	100	CDR-L3	P	P		P	P	P	P
95A		CDR-L3							
95B		CDR-L3							
95C		CDR-L3							
95D		CDR-L3							
95E		CDR-L3							
95F		CDR-L3							
96	101	CDR-L3	Y		Y	Y	Y	Y	Y
97	102	CDR-L3	T		T	T	T	T	T
98	103	Fr4	F		F	F	F	F	F
99	104	Fr4	G		G	G	G	G	G
100	105	Fr4	G		Q	G	G	G	G
101	106	Fr4	G		G	G	G	G	G
102	107	Fr4	T		T	T	T	T	T
103	108	Fr4	K		K	K	K	K	K
104	109	Fr4	L		L	L	L	L	L
105	110	Fr4	E		E	E	E	E	E
106	111	Fr4	I		I	I	I	I	I
106A	112	Fr4	K		K	K	K	K	K
107	113	Fr4	R			R	R	R	R

Bảng 5: Các đột biến ngược V_H, V_L và các đột biến khác cho 3D6 được làm tương thích với người

Biến thể V_H hoặc V_L	Trình tự nhận exon V_H hoặc V_L	Các thay đổi từ các gốc Khung nhận (hoặc CDR) (dựa và CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
Hu3D6VHv (SEQ ID NO:15)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H13, H17, H24, H38, H42, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81, H83, H91, H93
Hu3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H38, H42, H43, H76, H83, H93
Hu3D6VHv1b (SEQ ID NO:17)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H13, H17, H24, H38, H40, H42, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, H93
Hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO:18)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H24, H38, H40, H43, H48, H67, H80, H81, H82A, H83, H91, H93
Hu3D6VHv5 (SEQ ID NO:19)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H24, H28, H38, H40, H43, H48, H54, H60, H67, H80, H81, H82A, H83, H91, H93
Hu 3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO:46)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H24, H28, H38, H40, H48, H51, H54, H60, H67, H80, H82A, H83, H91, H93
Hu 3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO:47)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H24, H28, H38, H40, H48, H54, H60, H67, H80, H82A, H83, H91, H93
Hu3D6VHv1c (SEQ ID NO:48)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H13, H17, H24, H29, H38, H40, H42, H43, H54, H61, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, H93
Hu3D6VHv1d (SEQ ID NO:49)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H13, H17, H24, H27, H28, H29, H30, H38, H40, H42, H43, H51, H54, H60, H61, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, H93
Hu3D6VHv1e (SEQ ID NO:50)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H10, H12, H17, H24, H28, H38, H40, H42, H43, H48, H54, H60, H61, H76, H80, H82A, H83, H91, H93, H108, H109
Hu3D6VHv1f (SEQ ID NO:51)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H10, H12, H17, H24, H28, H38, H40, H43, H48, H51, H54, H60, H61, H82A, H83, H91, H93, H102, H108, H109

Biến thể V_H hoặc V_L	Trình tự nhận exon V_H hoặc V_L	Các thay đổi từ các gốc Khung nhận (hoặc CDR) (dựa và CDR tổ hợp Kabat/Chothia)
Hu3D6VHv3 (SEQ ID NO:52)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H38, H93
Hu3D6VHv3b (SEQ ID NO:53)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H17, H27, H29, H38, H61, H76, H82A, H93
Hu3D6VHv3c (SEQ ID NO:54)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H17, H27, H28, H29, H30, H38, H51, H54, H60, H61, H76, H82A, H93
Hu3D6VHv4 (SEQ ID NO:55)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H38, H40, H48, H66, H67, H76, H80, H82A, H83, H93
Hu3D6VHv4b (SEQ ID NO:56)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H17, H27, H29, H38, H40, H61, H80, H82A, H83, H93
Hu3D6VHv4c (SEQ ID NO:57)	Mã truy cập NCBI IMGT# IGHV1-69-2*01 (SEQ (ID NO: 25); mã truy cập NCBI IMGT# IGHJ1*01 (SEQ (ID NO: 26)	H12, H17, H27, H28, H29, H30, H38, H40, H51, H54, H60, H61, H80, H82A, H83, H93
Hu3D6VLv1 (SEQ ID NO:20)	Mã truy cập NCBI IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27); mã truy cập NCBI IMGT#IGKJ2*01 (SEQ (ID NO: 28)	L12, L36, L37, L45, L100
Hu3D6VLv2 (SEQ ID NO:21)	Mã truy cập NCBI IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27); mã truy cập NCBI IMGT#IGKJ2*01 (SEQ (ID NO: 28)	L36, L37, L100
Hu3D6VLv3 (SEQ ID NO:22)	Mã truy cập NCBI IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27); mã truy cập NCBI IMGT#IGKJ2*01 (SEQ (ID NO: 28)	L36, L37, L60, L100
Hu3D6VLv4 (SEQ ID NO:23)	Mã truy cập NCBI IMGT#IGKV2-30*02 (SEQ (ID NO: 27); mã truy cập NCBI IMGT#IGKJ2*01 (SEQ (ID NO: 28)	L2, L7, L12, L15, L36, L37, L45, L100

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 các kháng thể 3D6 được làm tương thích với người

Gốc	(Chuỗi nặng)IMGT# IGHV1-69-2*01	(Chuỗi nặng) IMGT# IGHJ1*01	3D6 chuột	Hu3D6 VHv1	Hu3D6 VHv2	Hu3D6 VHv1b	Hu3D6 VHv1bA11	Hu3D6 VHv5	Hu3D6VHv1bA11B6G2	Hu3D6VHv1bA11B6H3	Hu 3D6 VHv1c	Hu 3D6 VHv1d	Hu 3D6 VHv1e	Hu 3D6 VHv1f	Hu 3D6 VHv3	Hu 3D6 VHv3b	Hu 3D6 VHv3c	Hu 3D6 VHv4	Hu 3D6 VHv4b	Hu 3D6 VHv4c
H10	E		D	E	E	E	E	E	E	E	E	E	D	D	E	E	E	E	E	E
H12	K		V	V	K	V	V	V	V	V	K	K	V	V	K	K	K	V	V	V
H13	K		R	R	K	R	K	K	K	K	R	R	K	K	K	K	K	K	K	K
H17	T		L	L	S	L	T	T	T	T	L	L	L	L	T	L	L	T	L	L
H24	V		A	A	V	A	A	A	A	A	A	A	A	A	V	V	V	V	V	V
H27	Y		F	F	F	F	F	F	F	F	F	Y	F	F	F	Y	Y	F	Y	Y
H28	T		N	N	N	N	N	T	T	T	N	T	T	T	N	N	T	N	N	T
H29	F		I	I	I	I	I	I	I	I	F	F	I	I	I	F	F	I	F	F
H30	T		K	K	K	K	K	K	K	K	K	T	K	K	K	K	T	K	K	T
H38	Q		R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
H40	A		R	A	A	R	R	R	R	R	R	R	R	R	A	A	A	R	R	R
H42	G		E	E	E	E	G	G	G	G	E	E	E	G	G	G	G	G	G	G
H43	K		Q	Q	Q	Q	Q	Q	K	K	Q	Q	Q	Q	K	K	K	K	K	K
H48	M		I	I	M	I	I	I	I	I	M	M	I	I	M	M	M	I	M	M
H51	V		I	I	I	I	I	I	V	I	I	V	I	V	I	I	V	I	I	V
H54	D		N	N	N	N	N	D	D	D	N	D	N	D	N	N	D	N	N	D
H60	A		D	D	D	D	D	A	A	A	D	A	A	A	D	D	A	D	D	A
H61	E		P	P	P	P	P	P	P	P	E	E	E	E	P	E	E	P	E	E
H66	R		K	K	R	K	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	K	R	R
H67	V		A	A	V	A	A	A	A	A	V	V	V	V	V	V	V	A	V	V
H76	D		N	N	N	N	D	D	D	D	N	N	N	D	D	N	N	N	D	D
H80	M		L	L	M	L	L	L	L	L	L	L	L	M	M	M	M	L	L	L
H81	E		Q	Q	E	Q	Q	Q	E	E	Q	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
H82A	S		G	S	S	G	G	G	G	G	G	G	G	G	S	G	G	G	G	G
H83	R		T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	R	R	R	T	T	T
H91	Y		F	F	Y	F	F	F	F	F	F	F	F	F	Y	Y	Y	Y	Y	Y
H93	A	E	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
H102		H	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	Y	F	F	F	F	F	F
H108		L	T	L	L	L	L	L	L	L	L	L	T	T	L	L	L	L	L	L
H109		V	L	V	V	V	V	V	V	V	V	V	L	L	V	V	V	V	V	V

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 3D6 được làm tương thích với người

Gốc	(Chuỗi nhẹ) IMGT#IGKV2-30*02	(Chuỗi nhẹ) IMGT#IGKJ2*01	3D6 chuột	Hu3D6VLv1	Hu3D6VLv2	Hu3D6VLv3	Hu3D6VLv4
L2	V		V	V	V	V	I
L7	S		T	S	S	S	T
L12	P		S	S	P	P	S
L15	L		I	L	L	L	I
L36	F		L	L	L	L	L
L37	Q		L	L	L	L	L
L45	R		K	K	R	R	K
L60	D		D	D	D	S	D
L100		Q	G	G	G	G	G

Bảng 8: Tỷ lệ phần trăm tính chất người của chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể 3D6 được làm tương thích với người

Biến thể V_H hoặc V_L	% Tính chất người
Hu3D6VHv1 (SEQ ID NO:15)	70,40%
Hu3D6VHv2 (SEQ ID NO:16)	79,60%
Hu3D6VHv1b (SEQ ID NO:17)	69,40%
Hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO:18)	74,50%
Hu3D6VHv5 (SEQ ID NO:19)	77,60%
Hu3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO:46)	80,6%
Hu3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO:47)	79,6%
Hu3D6VHv1c (SEQ ID NO:48)	75,5%
Hu3D6VHv1d (SEQ ID NO:49)	81,6%
Hu3D6VHv1e (SEQ ID NO:50)	75,5%
Hu3D6VHv1f (SEQ ID NO:51)	80,6%
Hu3D6VHv3 (SEQ ID NO:52)	85,7%
Hu3D6VHv3b (SEQ ID NO:53)	85,7%
Hu3D6VHv3c (SEQ ID NO:54)	90,8%
Hu3D6VHv4 (SEQ ID NO:55)	76,5%
Hu3D6VHv4b(SEQ ID NO:56)	82,7%
Hu3D6VHv4c (SEQ ID NO:57)	87,8%
Hu3D6VLv1 (SEQ ID NO:20)	87%
Hu3D6VLv2 (SEQ ID NO:21)	89%
Hu3D6VLv3 (SEQ ID NO:22)	88%
Hu3D6VLv4 (SEQ ID NO:23)	87%

Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc, gốc được ngụy 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. Ví dụ về các gốc chính tắc/tương tác CDR bao gồm các gốc Kabat H24, H27, H29, H34, H38, và H67 trong các Bảng 3 và 4. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/gói (VH+VL) bao gồm các gốc Kabat H40, H43, H48, H91, H93, L36, L98, và L100 trong Bảng 3 và 4.

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

Q100G là đột biến của gốc tiếp xúc với gốc ở mặt phân cách. F36L và M89W là các đột biến của gốc ở mặt phân cách. V2I là tần số/đột biến bắt cặp dòng mầm. S7T là đột biến của gốc tương tự với S và có thể có khả năng gây miễn dịch tương tự. P12S là đột biến để cố gắng làm tăng sự tương tác với E105. L15I là đột biến thành gốc tương tự với L. R45K là đột biến thành gốc tương tự với R. D60S là đột biến thành S vì D là vị trí cắt proteaza được dự đoán.

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

V24A là đột biến của gốc chính tắc HCDR1. V67A là đột biến của gốc tiếp xúc với HCDR2. Q38R là đột biến của gốc chính tắc/gốc tương tác CDR. A40R, K43Q, và M48I là các đột biến của các gốc tiếp xúc với các gốc mặt phân cách. Y91F và A93S là các đột biến của các gốc mặt phân cách. K12V, M80L, và E81Q là các đột biến ngược dựa trên tần số hoặc các đột biến bắt cặp dòng mầm. S82aG là đột biến để kiểm tra khả năng liên kết tăng.

S ở gốc H17 Kabat trong hu3D6VHv2 thu được từ trình tự nhận VH người Acc. # BAC01986.1.

V ở gốc H20 Kabat trong hu3D6VHv1 và hu3D6VHv2 thu được từ trình tự nhận VH người Acc. # BAC01986.1. Y ở gốc H102 Kabat trong hu3D6VHv1f thu được từ khuôn cấu trúc Mus VH (PDB#1CR9_H; SEQ ID NO:70) và từ kháng thể đơn dòng chuột kháng tau 6A10.

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

hu3D6VLv1 (SEQ ID NO: 20):

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

hu3D6VLv2 (SEQ ID NO: 21):

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

hu3D6VLv3 (SEQ ID NO: 22):

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPRRLIYLVSKLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

hu3D6VLv4 (SEQ ID NO: 24):

DIVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRLIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGTKLEIKR

CHUỖI NẶNG BIẾN ĐỔI

hu3D6VHv1 (SEQ ID NO: 15):

EVQLVQSGAEVVRPGALVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPEQGLEWIGWIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS

hu3D6VHv2 (SEQ ID NO: 16):

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIKDYYLHWVRQAPEQGLEWM
GWIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYMELSSLTSEDTAVYYCSTLDFW
GQGTLVTVSS

hu3D6VHv1b (SEQ ID NO: 17):

EVQLVQSGAEVVRPGALVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIG
WIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG
QGTLVTVSS

hu3D6VHv1bA11 (SEQ ID NO: 18):

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIG
WIDPENGDTVYDPKFQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG
QGTLVTVSS

hu3D6VHv5 (SEQ ID NO: 19):

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIG
WIDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG
QGTLVTVSS

hu3D6VHv1bA11B6G2 (SEQ ID NO:46):

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGKGLEWIG
WVDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG
QGTLVTVSS

hu3D6VHv1bA11B6H3 (SEQ ID NO:47):

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGKGLEWIG
WIDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQ
GTLVTVSS

hu3D6VHv1c (SEQ ID NO: 48):

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGFNFKDYYLHWVRQRPEQGLEWM
GWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFW
GQGTLVTVSS

hu3D6VHv1d (SEQ ID NO: 49):

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGYTFTDYYLHWVRQRPEQGLEWM GWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFW GQGTLVTVSS

hu3D6VHv1e (SEQ ID NO: 50).

EVQLVQSGADVvkPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIGW IDPENGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLeLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQG TTLTVSS

hu3D6VHv1f (SEQ ID NO: 51):

EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIG WVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELGSLTSEDTAVYFCSTLDYW GQGTTLTVSS

hu3D6VHv3 (SEQ ID NO:52):

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQAPGKGLEWM GWIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

hu3D6VHv3b (SEQ ID NO:53):

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQAPGKGLEWM GWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

hu3D6VHv3c (SEQ ID NO: 54):

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQAPGKGLEWM GWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDTAVYYCSTLDF WGQGTLVTVSS

hu3D6VHv4 (SEQ ID NO: 55):

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQRPGKGLEWIG WIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFWG QGTLVTVSS

hu3D6VHv4b (SEQ ID NO: 56):

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQRPGKGLEWM GWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

hu3D6VHv4c (SEQ ID NO: 57):

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQRPGKGLEWM GWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

Ví dụ 4. Kháng thể đơn dòng chuột liên kết với tau trong thử nghiệm ELISA

Phương pháp: ELISA gián tiếp: Các đĩa polystyren 96 giếng được phủ bằng kháng thể bắt giữ kháng 6xHis (Fig.5A) hoặc đa dòng kháng tau (Dako #A0024, Fig.5B) được tạo huyền phù trong 1xPBS trong 2 giờ ở RT hoặc 16 giờ ở 4°C. Lớp phủ được loại bỏ, và các đĩa được phong bế trong 1 giờ với 1% BSA trong 1xPBS, sau đó ủ với tau người tái tổ hợp, với (Fig.5A) hoặc không cùng với (Fig.5B) đuôi polyhistidin ở đầu cùng N của protein này. Sau khi rửa, các đĩa được ủ với các kháng thể đã chỉ định, được rửa và được ủ với kháng thể thứ cấp dê kháng chuột được liên hợp HRP. Các đĩa được phát triển với TMB, và A_{450} được đo với máy đọc đĩa.

ELISA bánh kẹp: Các đĩa polystyren 96 giếng được phủ bằng các kháng thể kháng chuột trong 1xPBS trong 2 giờ ở RT hoặc 16 giờ ở 4°C. Lớp phủ được loại bỏ, và các đĩa được phong bế trong 1 giờ với 1% BSA trong 1xPBS. Đĩa này được ủ tiếp với các kháng thể đã chỉ định ở các nồng độ giống nhau, được pha loãng trong 0,1% BSA trong 1xPBS. Các đĩa được xử lý liên tục với tau người, kháng thể đa dòng thỏ kháng tau (Dako #A0024), và kháng thể dê kháng thỏ được liên hợp HRP, tất cả được pha loãng trong 0,1% BSA trong PBS và việc rửa được thực hiện giữa mỗi bước. Streptavidin-HRP được bổ sung vào, các đĩa được phát triển với TMB, và A_{450} được đo với máy đọc đĩa. Xem Fig.5C.

Các kết quả: Panen chứa kháng thể sản sinh bởi tế bào lai được thử nghiệm về khả năng liên kết với tau qua nhiều phương thức ELISA khác nhau. Sự phát hiện tau được xác nhận bằng cách sử dụng phương thức gián tiếp, sử dụng protein tau được bất động bởi đuôi polyhistidin được dung hợp đầu cùng N của nó (Fig.5A). Sự liên kết với protein tự nhiên, không gắn đuôi cũng được xác nhận (Fig.5B). Để đánh giá ái lực dung dịch của

nhiều kháng thể khác nhau, phương thức ELISA bánh kẹp được sử dụng, trong đó các kháng thể tế bào lai đã thử nghiệm được sử dụng làm chất phản ứng bắt giữ (Fig.5C).

Ví dụ 5. Ái lực của các kháng thể đơn dòng chuột với tau

Phương pháp: Phân tích SPR được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 để xác định động học liên kết của kháng thể chuột với tau người tái tổ hợp. Để chuẩn bị bề mặt cảm biến, kháng thể kháng chuột (GE Life Sciences) được bất động trên chip cảm biến CM5 nhờ phản ứng tạo cặp amin, và kháng thể 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 µL/phút trong đệm chạy (HBS + 0,05% P-20, BSA 1 mg/mL), để kết hợp 180 giây và phân ly 900 giây. Dữ liệu được tham chiếu hai lần đến cả bộ cảm biến không liên quan không chứa 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 chỉnh hợp chung 1:1.

Kết quả: Nhiều kháng thể chuột được chọn dựa vào hoạt động của chúng trong bộ thử nghiệm ELISA, và ái lực liên kết của chúng được đánh giá bằng SPR. Các kháng thể được thử nghiệm trong các bộ song song, và tốc độ phân ly và kết hợp liên kết của chúng được so sánh với nhau để chọn ra chất liên kết mạnh nhất với tau người tái tổ hợp. Ái lực liên kết cao nhất được quan sát thấy đối với dòng kháng thể 3D6. Các ái lực liên kết được thể hiện trong Fig.6.

Ví dụ 6. Các kháng thể chuột đơn dòng ngăn cản sự liên kết của tau người với bề mặt của tế bào nơron đã được làm bất tử.

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

1. Các tế bào B103 đã được tạo huyền phù lại trong PBS ở mật độ 5 x 10^5 tế bào/mL. Đĩa 50µL huyền phù tế bào mỗi giếng trong đĩa Liên Kết Cao MSD. Bước này tạo ra 25K tế bào/giếng. Đậy đĩa này và để cho các tế bào gắn kết ở 37°C, CO_2 5%, trong 2 giờ.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

9. Bổ sung 150 µL 1X đệm đọc T không có chất hoạt động bề mặt (được pha loãng trong H_2O) và đọc ngay trên thiết bị MSD SECTOR™ 600. Tránh đưa bong bóng vào khi bổ sung đệm đọc.

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

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

Các kết quả:

Tín hiệu kháng tau Sulfo Tag giảm dần xảy ra với kháng thể thử nghiệm tăng dần chỉ ra tác dụng phong bế chức năng sự liên kết tau với bề mặt tế bào nơron. Không có tác

dụng phong bế nào được quan sát thấy với đối chứng isotyp, 16G7, hoặc 3H9. Các lượng tăng dần của hoạt tính phong bế chức năng được quan sát thấy với 4C5, 5G8, và 3D6. 3D6 thể hiện hoạt tính phong bế sâu nhất của các kháng thể được thử nghiệm. Xem Fig.7.

Ví dụ 7. Hoạt tính phân tách

Phương pháp: 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.

Ủ với các kháng thể —Các kháng thể được ủ với tau tái tổ hợp, đã kết tụ ở các tỷ 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 (450/482 kích thích/phát xạ). Các tín hiệu là nền được trừ đi các mẫu đệm.

Các kết quả: Như được thể hiện trong Fig.8, 3D6 phân tách ưu tiên các sợi tau không hoạt động. Các tỷ lệ mol khác nhau của 3D6 (hình tam giác), đối chứng isotyp (vòng tròn) và 16G7 (hình vuông) được ủ với các sợi tau chứa dạng 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. 3D6 ưu tiên làm giảm tín hiệu Thioflavin T có mặt trong mẫu này, so với cả kháng thể đối chứng isotyp cũng như 16G7, kháng thể kháng tau mà liên kết với vùng khác của tau.

Ví dụ 8. 3D6 và 5G8 bắt giữ miễn dịch tau từ mô mắc bệnh của người.

Phương pháp: Các phân đoạn protein hòa tan hàm lượng muối cao được điều chế đến 1 mg/ml. Đối với mỗi kết tủa miễn dịch, 200 µg mẫu được sử dụng. 10µg kháng thể đã chỉ định (đối chứng isotyp, 3D6, hoặc kháng thể kháng tau 5G8) được bổ sung vào chế phẩm mẫu có hàm lượng muối cao, và được ủ trong 2 giờ. Sau đó các hạt từ protein G được bổ sung vào các hỗn hợp, và được ủ thêm một giờ nữa để bắt giữ phức hợp kháng thể/kháng nguyên. Các mẫu được rửa kỹ bằng 1xPBS, và các hạt được luộc trong đệm mẫu khử/biến tính để giải phóng các protein bị bắt giữ. Các mẫu thu được được phân tích bằng SDS-PAGE và phân tích thấm tách Tây được thực hiện bằng cách sử dụng kháng thể đa dòng kháng tau (Dako, #A0024).

Các kết quả: Như được thể hiện trong Fig.9, 3D6 và 5G8 gây kết tủa miễn dịch tau từ mô bị bệnh Alzheimer. Các phân đoạn hòa tan có hàm lượng muối cao được kết tủa miễn dịch bằng kháng thể đã chỉ định, và được phát hiện bằng kháng thể đa dòng kháng tau được định hướng đến vùng riêng biệt của phân tử tau từ các vị trí liên kết cho 3D6 và kháng thể tau A. 3D6 bắt giữ mạnh tau từ phân đoạn này. Đầu vào (mẫu hòa tan có hàm lượng muối cao) được thể hiện ở bên phải.

Ví dụ 9. Phản ứng miễn dịch hóa học mô miễn dịch của 3D6,

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 xét nghiệm tử thi. Hóa học mô miễn dịch được thực hiện trên lát cắt đông lạnh được gắn trên phiến kính 10um, 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 3D6 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, mà 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 liền kề với kháng thể đối chứng isotyp IgG.

Các kháng thể được kiểm tra là CD6 chuột, 3D6 khảm (chứa VH và VL từ kháng thể chuột với vùng hằng định của người, chuỗi nặng SEQ ID NO:72 và chuỗi nhẹ SEQ ID NO:73), và biến thể được làm tương thích với người hu3D6VHv5/hu3D6VLv2.

Bước nhuộm được thực hiện với các dạng của chuột, khảm, và được làm tương thích với người của 3D6 được so sánh định tính và được đánh giá về độ đậm và mật 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 3D6, 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 10. Ái lực của các biến thể được làm tương thích với người đối với tau

Phương pháp: các đĩa polystyren 96 giếng ELISA gián tiếp được phủ bằng tau người tái tổ hợp được tạo huyền phù trong 1xPBS trong 2 giờ ở RT hoặc 16 giờ ở 4°C. Lớp phủ được loại bỏ, và các đĩa được phong bế trong 1 giờ bằng BSA 1% trong 1xPBS. Các kháng thể đã chỉ định ở 1 µg/mL trong BSA 0,1% trong 1xPBS được bổ sung vào các đĩa trong 1 giờ sau đó rửa, và kháng thể dê kháng người liên hợp HRP được bổ sung vào. Các đĩa được phát triển với TMB, và A_{450} được đo với máy đọc đĩa.

Các đĩa polystyren 96 giếng ELISA bánh kẹp được phủ bằng các kháng thể kháng người trong 1xPBS trong 2 giờ ở RT hoặc 16 giờ ở 4°C. Lớp phủ được loại bỏ, và các đĩa được phong bế trong 1 giờ với BSA 1% trong 1xPBS. Các kháng thể đã chỉ định ở nhiều nồng độ khác nhau như đã chỉ định, được pha loãng trong BSA 0,1% trong 1xPBS được bổ sung vào các đĩa trong 1 giờ sau đó rửa, và tau người tái tổ hợp được biotinyl hóa được pha loãng trong BSA 0,1% trong 1xPBS được bổ sung vào. Sau khi rửa, Streptavidin-HRP được bổ sung vào, các đĩa được phát triển với TMB, và A_{450} được đo bằng máy đọc đĩa.

Phân tích SPR được thực hiện bằng cách sử dụng Biacore T200 để xác định động học liên kết của h3D6-VHv5-L2 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 nhờ tạo cặp amin, và hu3D6VHv5 / hu3D6VLv2 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 µL/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 chỉnh hợp chung 1:1.

Các kháng thể thử nghiệm là 3D6 khảm (chứa các vùng VH và VL chuột với các vùng hằng định người; SEQ ID NO:72 (chuỗi nặng) và SEQ ID NO:73 (chuỗi nhẹ), và các biến thể được làm tương thích với người (hu3D6VHv1b/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv1c/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv1d/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv1e/ hu3D6VLv2,

hu3D6VHv1f/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv2/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv3/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv3b/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv3c/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv4/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv4b/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv4c/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv5/hu3D6VLv2, hu3D6VHv1bB6A11/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv1bB6A11B6G2/ hu3D6VLv2, hu3D6VHv1bB6A11B6H2/ hu3D6VLv2).

Fig.10A: Nhiều trình tự ứng viên từ bước làm tương thích 3D6 với người được thử nghiệm bằng ELISA để so sánh sự liên kết với tau người tái tổ hợp. Các trị số độ hấp thụ được so sánh và được chuẩn hóa đến trị số cho 3D6 khảm, mà chứa VH và VL từ kháng thể chuột. Nhiều trình tự ứng viên có khả năng liên kết tương tự khi được so sánh với kháng thể khảm, với hu3D6VHv5/hu3D6VLv2 thể hiện khả năng phản ứng cao nhất.

Fig.10B: Khả năng liên kết của hu3D6VHv5/hu3D6VLv2 được so sánh với 3D6 khảm nhờ đường cong nồng độ trong ELISA bánh kẹp, với 3D6 khảm và hu3D6VHv5/hu3D6VLv2 được sử dụng làm chất phản ứng bắt giữ tau. Cả hai kháng thể đều thể hiện đường cong liên kết tương tự, chỉ ra ái lực tương tự.

Fig.10C: Ái lực của hu3D6VHv5/hu3D6VLv2 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 chỉnh hợp chung 1:1. Ái lực động học, tốc độ liên hợp, và tốc độ phân ly được thể hiện ở đây, và ưu tiên so sánh với các trị số 3D6 chuột.

Danh mục trình tự

P10636-8 (SEQ ID NO:1)

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPL QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA EEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRG AAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRT PSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKH QPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKC GSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLT FRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEV SASLAKQGL

P10636-7 (SEQ ID NO:2)

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPL
QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSK
DGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSG
EPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRL
QTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNI
KHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQ
SKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPR
HLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

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

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEE
AGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAA
PPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSL
PTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQP
GGGKVQIINKKLDLSNVQSKCGSKDNIKHVPGGGSVQIVYKPVDLSKVTSKCGS
LGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFR
ENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSA
SLAKQGL

P10636-5 (SEQ ID NO:4)

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPL
QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEDVTAPLVDEGAPGKQAAAQPHTEIPEGTTA
EEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRG
AAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRT
PSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKH
QPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSK
IGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHL
SNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

P10636-4 (SEQ ID NO:5)

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKESPL
QTPTEDGSEEPGSETSDAKSTPTAEAEEAGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSK

DGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAAPPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSG
EPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSLPTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRL
QTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQPGGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNI
HHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIGSLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENA
KAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSNVSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLA
KQGL

P10636-2 (SEQ ID NO:6)

MAEPRQEFEVMEDHAGTYGLGDRKDQGGYTMHQDQEGDTDAGLKAEE
AGIGDTPSLEDEAAGHVTQARMVSKSKDGTGSDDKKAKGADGKTKIATPRGAA
PPGQKGQANATRIPAKTPPAPKTPPSSGEPPKSGDRSGYSSPGSPGTPGSRSRTPSL
PTPPTREPKKVAVVRTPPKSPSSAKSRLQTAPVPMPDLKNVKSKIGSTENLKHQP
GGGKVQIVYKPVDLSKVTSKCGSLGNIHHKPGGGQVEVKSEKLDFKDRVQSKIG
SLDNITHVPGGGNKKIETHKLTFRENAKAKTDHGAEIVYKSPVVSGDTSPRHLSN
VSSTGSIDMVDSPQLATLADEVSASLAKQGL

SEQ ID NO:7; Trình tự axit amin 3D6 VH của chuột:

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIG
WIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG
QGTTLTVSS

SEQ ID NO:8; Kabat/Chothia HCDR1:

GFNIKDYYLH

SEQ ID NO:9; Kabat HCDR2:

WIDPENGDTVYDPKFQG

SEQ ID NO:10; Kabat HCDR3:

LDF

SEQ ID NO:11; trình tự axit amin 3D6 VL của chuột:

DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKR
LIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGG
TKLEIKR

SEQ ID NO:12; LCDR1 Kabat của chuột:

KSSQSLLDSDGKTYLN

SEQ ID NO:13; LCDR2 Kabat của chuột:

LVSKLDS

SEQ ID NO:14; LCDR3 Kabat của chuột:

WQGTHFPYT

SEQ ID NO:15; hu3D6VHv1:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKVSCKASGFNIKDYYLHWVRQAPEQGLEWIG WIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLSSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQ GTLVTVSS

SEQ ID NO:16; hu3D6VHv2:

EVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKVSGFNIKDYYLHWVRQAPEQGLEWM GWIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYMELSSLTSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

SEQ ID NO:17; hu3D6VHv1b:

EVQLVQSGAEVVRPGALVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIG WIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG QGTLVTVSS

SEQ ID NO:18; hu3D6VHv1bA11:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIG WIDPENGDTVYDPKFQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG QGTLVTVSS

SEQ ID NO:19; hu3D6VHv5:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIG WIDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG QGTLVTVSS

SEQ ID NO:20; hu3D6VLv1:

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKR LIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIKR

SEQ ID NO:21; hu3D6VLv2:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPRR LIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIKR

SEQ ID NO:22; hu3D6VLv3:

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPRR LIYLVSKLDSGVPSRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIKR

SEQ ID NO:23; hu3D6VLv4:

DIVMTQTPLSLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQKPGQSPKRL IYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGGT KLEIKR

SEQ ID NO:24 ; kháng thể nhận biến đổi chuỗi nặng Acc.# BAC01986.1

QVQLQQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFGSYAISWVRQAPGQGLEWM GRIIPILGIATYAQKFQGRVTITADKSTSTAYMDLSSLRSEDTAVYYCARGKGEFE GMDVWGQGTTVTVSS

SEQ ID NO:25 ; kháng thể nhận biến đổi chuỗi nặng Acc.# IMGT# IGHV1-69-2*01

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTDYYMHWVQQAPGKGLEWM GLVDPEDGETIYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCAT

SEQ ID NO:26 ; kháng thể nhận biến đổi chuỗi nặng Acc.# IMGT#IGKJ1*01

QHWGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:27; trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ Acc. # IMGT#IGKV2-30*02 Acc. # IMGT#IGKV2-30*02

DVVMTQSPLSLPVTLGQPASISCRSSQSLVHSDGNTYLNWFQQRPGQSPRR LIYKVSNRDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTHWP

SEQ ID NO:28; trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ Acc. # IMGT#IGKJ2*01

YTFGQGTKLEIK

SEQ ID NO:29; trình tự nhận biến đổi chuỗi nhẹ Acc. # AAZ09048.1

DVVMTQSPLSLTVTLGQPASISCRSSQSLVYSDGNTYLNWFQQRPGQSPRR
LIYRVSHWDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQGTYWPLTFGQ
GTKLEIK

SEQ ID NO:30 ; trình tự axit nucleic 3D6 VH chuột:

GAGGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGACCTTGTGAGGCCAGGGGCC
TTAGTCAAGTTGTCCTGCAAAGCTTCTGGCTTCAACATTAAAGACTACTATTT
GCACTGGGTGAGGCAGAGGCCTGAACAGGGCCTGGAGTGGATTGGATGGATT
GATCCTGAGAATGGTGATACTGTATATGACCCGAAGTTCCAGGGCAAGGCCA
CTATAACAGCAGACACATCCTCCAATACAGCCTACCTGCAGCTCGGCAGCCT
GACATCTGAGGACACTGCCGTCTATTTCTGTTCTACCCTTGACTTCTGGGGCC
AAGGCACCACTCTCACAGTCTCCTCA

SEQ ID NO:31; Trình tự axit nucleic 3D6 VL của chuột:

GATGTTGTGATGACCCAGACTCCACTCACTTTGTCGGTTACCATTGGAC
AACCAGCCTCCATCTCTTGCAAGTCAAGTCAGAGCCTCTTAGATAGTGATGG
AAAGACATATTTGAATTGGTTGTTACAGAGGCCAGGCCAGTCTCCAAAGCGC
CTAATCTATCTGGTGTCTAAACTGGACTCTGGAGTCCCTGACAGGTTCACTGG
CAGTGGATCAGGGACAGATTTCACACTGAAAATCAGCAGAGTGGAGGCTGA
GGATTTGGGAGTTTATTATTGCTGGCAAGGTACACATTTTCCGTACACGTTCG
GAGGGGGGACCAAGCTGGAAATAAAACGT

SEQ ID NO:32; Kabat CDR-H1 chuột

DYYLH

SEQ ID NO:33; Chothia CDR-H1 chuột

GFNIKDY

SEQ ID NO:34; Chothia CDR-H2 chuột

DPENGD

SEQ ID NO:35; AbM CDR-H2 chuột

WIDPENGDTV

SEQ ID NO:36; Contact CDR-L1 chuột

KTYLNWL

SEQ ID NO:37; Contact CDR-L2 chuột

RLIYLVSKLD

SEQ ID NO:38; Contact CDR-L3 chuột

WQGTHFPY

SEQ ID NO:39; Contact CDR-H1 chuột

KDYYLH

SEQ ID NO:40; Contact CDR-H2 chuột

WIGWIDPENGDTV

SEQ ID NO:41; Contact CDR-H3 chuột

STLD

SEQ ID NO: 42; CDR-H1 Kabat-Chothia xen kẽ

GFTIKDYYLH

SEQ ID NO: 43; CDR-H2 Kabat xen kẽ

WIDPEDGDTVYAPKFQG

SEQ ID NO:44; trình tự axit amin VH liên ứng từ Fig.2

EVQLVQSGAEVVXPGALVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIG WIDPENGDTVYDPKFQGXATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG QGTLVTVSS

SEQ ID NO:45; trình tự axit amin VL liên ứng

DVVMTQSPLSLSVTLGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKR LIYLVSKLDSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIKR

SEQ ID NO:46; hu3D6VHv1bA11B6G2:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGKGLEWIG WVDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG QGTLVTVSS

SEQ ID NO:47; hu3D6VHv1bA11B6H3:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGKGLEWIG WIDPEDGDTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQ GTLVTVSS

SEQ ID NO:48; hu3D6VHv1c:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGFNFKDYYLHWVRQRPEQGLEWM GWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFW GQGTLVTVSS

SEQ ID NO:49; hu3D6VHv1d:

EVQLVQSGAEVKRPGALVKISCKASGYTFTDYYLHWVRQRPEQGLEWM GWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFW GQGTLVTVSS

SEQ ID NO:50; hu3D6VHv1e:

EVQLVQSGADVvkPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIGW IDPENGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLeLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQG TTLTVSS

SEQ ID NO:51; hu3D6VHv1f:

EVQLVQSGADVVKPGALVKISCKASGFTIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIG WVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELGSLTSEDTAVYFCSTLDYW GQGTTLTVSS

SEQ ID NO:52; hu3D6VHv3:

EVQLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQAPGKGLEWM GWIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

SEQ ID NO:53; hu3D6VHv3b:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQAPGKGLEWM GWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

SEQ ID NO:54; hu3D6VHv3c:

EVQLVQSGAEVKKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQAPGKGLEWM GWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDTAVYYCSTLDF WGQGTLVTVSS

SEQ ID NO:55; hu3D6VHv4:

EVQLVQSGAEVVKPGATVKISCKVSGFNIKDYYLHWVRQRPGKGLEWIG WIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFWG QGTLVTVSS

SEQ ID NO:56; hu3D6VHv4b:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYNFKDYYLHWVRQRPGKGLEWM GWIDPENGDTVYDEKFQGRVTITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

SEQ ID NO:57; hu3D6VHv4c:

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKVSGYTFTDYYLHWVRQRPGKGLEWM GWVDPEDGDTVYAEKFQGRVTITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFW GQGTLVTVSS

SEQ ID NO: 58; CDR-H1 Kabat-Chothia xen kẽ (thu được từ hu3D6VH1c).

GFNFKDYYLH

SEQ ID NO: 59; CDR-H1 Kabat-Chothia xen kẽ, (thu được từ hu3D6VHv1d, hu3D6VHv3c, và hu3D6VHv4c).

GYTFTDYYLH

SEQ ID NO: 60; CDR-H1 Kabat-Chothia xen kẽ (thu được từ hu3D6VHv3b và hu3D6VHv4b)

GYNFKDYYLH

SEQ ID NO: 61; CDR-H2 Kabat xen kẽ (thu được từ hu3D6VHv1bA11B6G2).

WVDPEDGDTVYAPKFQG

SEQ ID NO: 62, CDR-H2 Kabat xen kẽ (thu được từ hu3D6VHv1c, hu3D6VHv3b, AND hu3D6VHv4b.

WIDPENGDTVYDEKFQG

SEQ ID NO: 63; CDR-H2 Kabat xen kẽ thu được từ hu3D6VHv1d, hu3D6VHv1f, hu3D6VHv3c, và hu3D6VHv4c).

WVDPEDGDTVYAEKFQG

SEQ ID NO: 64; CDR-H2 Kabat xen kẽ (thu được từ hu3D6VHv1e).

WIDPENGDTVYAEKFQG

SEQ ID NO: 65; CDR-H3 Kabat xen kẽ (thu được từ hu3D6VHv1f)

LDY

SEQ ID NO:66; vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 6A10 của chuột.

EVQLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGLNIKDYYIHWVKQRPEQGLEWIG WIDPENDDTEYAPKFQGRATLTTDTSSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCTPLDYWG QGTSVTVSS

SEQ ID NO: 67; CDR-H1 tổ hợp Kabat/Chothia của kháng thể 6A10 của chuột.

GLNIKDYYIH

SEQ ID NO:68; CDR-H2 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột.

WIDPENDDTEYAPKFQG

SEQ ID NO: 69; CDR-H3 Kabat của kháng thể 6A10 của chuột

LDY

SEQ ID NO:70; khuôn cấu trúc Mus VH (PDB#1CR9_H)

KVKLQQSGAELVRSGASVKLSCTASGFNIKDYYIQWVKQRPEQGLEWIG WIDPENGNSEYAPRFQGKATMTADTLSNTAYLQLSSLTSEDTAVYYCNADLHDY WGQGTTLTVSS

SEQ ID NO:71; trình tự axit amin VH liên ứng từ các Fig.4A và 4B

EVQLVQSGAEVVKPGALVKISCKASGFNIKDYYLHWVRQRPGQGLEWIG WIDPENGDTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQ GTLVTVSS

SEQ ID NO: 72; chuỗi nặng của kháng thể 3D6 khảm

EVQLQQSGADLVRPGALVKLSCKASGFNIKDYYLHWVRQRPEQGLEWIG WIDPENGDTVYDPKFQGKATITADTSSNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWG QGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPK SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVK FNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNK ALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWE SNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK

SEQ ID NO: 73; chuỗi nhẹ của kháng thể 3D6 khảm

DVVMTQTPLTLSVTIGQPASISCKSSQSLLDSDGKTYLNWLLQRPGQSPKR LIYLVSKLDSGVPDRFTGSGSGTDFTLKISRVEAEDLGVYYCWQGTHFPYTFGGG TKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNR GEC

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đơn dòng được phân lập liên kết với tau người, kháng thể này bao gồm ba CDR chuỗi nặng theo tổ hợp Kabat/Chothia, CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:8, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:9, và CDR-H3 có trình tự axit amin LDF, và ba CDR chuỗi nhẹ theo tổ hợp Kabat/Chothia, CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:12, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13, và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14, ngoại trừ vị trí H27 bị chiếm bởi F hoặc Y, H28 bị chiếm bởi N hoặc T, H29 bị chiếm bởi I hoặc F, H30 bị chiếm bởi K hoặc T, vị trí H51 bị chiếm bởi I hoặc V, vị trí H54 bị chiếm bởi N hoặc D, vị trí H60 bị chiếm bởi D hoặc A, H61 bị chiếm bởi P hoặc E, và H102 bị chiếm bởi F hoặc Y.

2. Kháng thể theo điểm 1, bao gồm ba CDR chuỗi nặng theo tổ hợp Kabat/Chothia, CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 8, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:9, và CDR-H3 có trình tự axit amin LDF, và ba CDR chuỗi nhẹ theo tổ hợp Kabat/Chothia, CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13 và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID No: 14.

3. Kháng thể theo điểm 1 bao gồm 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 hoặc dạng khảm, được ngụy trang hoặc được làm tương thích với người của nó.

4. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 58, SEQ ID NO: 59 hoặc SEQ ID NO: 60.

5. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 43, SEQ ID NO: 61, SEQ ID NO: 62, SEQ ID NO: 63 hoặc SEQ ID NO: 64.

6. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-H3 có trình tự axit amin LDY.

7. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người.

8. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 7, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 43.

9. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 7, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:61.

10. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 7, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:64

11. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 7, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 42, CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:63, và CDR-H3 có trình tự axit amin LDY.

12. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 7, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 58 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:62.

13. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 7, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 59 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:63.

14. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 7, trong đó CDR-H1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 60 và CDR-H2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:62.

15. Kháng thể theo điểm 3, trong đó kháng thể này được làm tương thích với người hoặc là kháng thể khảm.

16. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 15 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:8, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:9 và CDR-H3 có trình tự axit amin LDF và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:12, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13 và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.

17. Kháng thể được làm tương thích với người liên kết với tau người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành chứa ba CDR chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO:7 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành chứa ba CDR chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 11, trong đó các CDR là theo định nghĩa được chọn từ nhóm bao gồm Kabat, Chothia, tổ hợp Kabat/Chothia, AbM và Contact.

18. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 17, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng theo tổ hợp Kabat/Chothia, CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:8, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:9, và CDR-H3 có trình tự axit amin LDF và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ theo tổ hợp

Kabat/Chothia, CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13, CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.

19. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 17, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng theo Kabat, CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:32, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:9, và CDR-H3 có trình tự axit amin LDF và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ theo Kabat, CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 12, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13, CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.

20. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 17, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Chothia, CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:33, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:34, và CDR-H3 có trình tự axit amin LDF và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Chothia, CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:12, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13 và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.

21. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 17, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng AbM, CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:8, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:35, và CDR-H3 có trình tự axit amin LDF và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ AbM, CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:12, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:13, và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:14.

22. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 17, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng Contact, CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:39, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:40, CDR-H3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:41 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ Contact, CDR-L1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:36, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:37 và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO:38.

23. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 15, 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 các SEQ ID NO: 15 đến SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 46 đến SEQ ID NO: 57 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: 20 đến SEQ ID NO: 23, ngoại trừ vị trí H17 có thể là T hoặc S, và vị trí H20 có thể là I hoặc V.

24. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 23, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H38 bị chiếm bởi R và H93 bị chiếm bởi S.

25. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 23, với điều kiện là các vị trí H38 và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và S.

26. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 23, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H38 bị chiếm bởi R, H43 bị chiếm bởi Q, H83 bị chiếm bởi T, và H93 bị chiếm bởi S.

27. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 26, với điều kiện là các vị trí H38, H43, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, Q, T, và S.

28. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 26, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H24 bị chiếm bởi A, H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, H81 bị chiếm bởi Q, và H91 bị chiếm bởi F.

29. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 28, với điều kiện là các vị trí H12, H24, H48, H67, H80, H81, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, I, A, L, Q, và F.

30. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 28, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H13 bị chiếm bởi R và H66 bị chiếm bởi K.

31. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 30, với điều kiện là các vị trí H13 và H66 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và K.

32. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 28, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H40 bị chiếm bởi R và H82a bị chiếm bởi G.

33. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 32, với điều kiện là các vị trí H40 và H82a trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và G.

34. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 26, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H42 bị chiếm bởi E và H76 bị chiếm bởi N.

35. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 34, với điều kiện là các vị trí H42 và H76 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi E và N.

36. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 24, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H40 bị chiếm bởi R, H82a bị chiếm bởi G, và H83 bị chiếm bởi T.

37. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 36, với điều kiện là các vị trí H40, H82a, và H83 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, G, và T.

38. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 36, trong đó H12 trong vùng VH bị chiếm bởi V.

39. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 38, trong đó H80 trong vùng VH bị chiếm bởi L.

40. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 39, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H24 bị chiếm bởi A, H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, và H91 bị chiếm bởi F.

41. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 40, với điều kiện là các vị trí H24, H48, H67, H80, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A, I, A, L, và F.

42. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 39, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H43 bị chiếm bởi Q, và H81 bị chiếm bởi Q.

43. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 42, với điều kiện là các vị trí H43 và H81 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi Q, và Q.

44. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 36, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H24 bị chiếm bởi A, và H91 bị chiếm bởi F.

45. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, với điều kiện là các vị trí H24 và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A và F.

46. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 44, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H13 bị chiếm bởi R, H17 bị chiếm bởi L, H29 bị chiếm bởi F, H42 bị chiếm bởi E, H43 bị chiếm bởi Q, H61 bị chiếm bởi E, H76 bị chiếm bởi N, H80 bị chiếm bởi L, H81 bị chiếm bởi Q.

47. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 46, với điều kiện là các vị trí H13, H17, H29, H42, H43, H61, H76, H80, và H81 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, F, E, Q, E, N, L, và Q.

48. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 38, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H24 bị chiếm bởi A, H28 bị chiếm bởi T, H48 bị chiếm bởi I, H54 bị chiếm bởi D, H60 bị chiếm bởi A, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, và H91 bị chiếm bởi F.

49. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 48, với điều kiện là các vị trí H24, H28, H48, H54, H60, H67, H80, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi A, T, I, D, A, A, L, và F.

50. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 38, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H10 bị chiếm bởi D, H17 bị chiếm bởi L, H24 bị chiếm bởi A, H28 bị chiếm bởi T, H43 bị chiếm bởi Q, H48 bị chiếm bởi I, H60 bị chiếm bởi A, H61 bị chiếm bởi E, H91 bị chiếm bởi F, H108 bị chiếm bởi T, và H109 bị chiếm bởi L.

51. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 50, với điều kiện là các vị trí H10, H17, H24, H28, H43, H48, H60, H61, H91, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, L, A, T, Q, I, A, E, F, T, và L.

52. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 39, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H17 bị chiếm bởi L, H27 bị chiếm bởi Y, H29 bị chiếm bởi F, và H61 bị chiếm bởi E

53. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 52, với điều kiện là các vị trí H17, H27, H29, và H61 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, và E.

54. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 24, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H17 bị chiếm bởi L, H27 bị chiếm bởi Y, H29 bị chiếm bởi F, H61 bị chiếm bởi E, H76 bị chiếm bởi N, và H82a bị chiếm bởi G.

55. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 54, với điều kiện là các vị trí H17, H27, H29, H61, H76, và H82a trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, E, N, và G.

56. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 24, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H17 bị chiếm bởi L, H24 bị chiếm bởi A, H43 bị chiếm bởi Q, H48 bị chiếm bởi I, H83 bị chiếm bởi T, và H91 bị chiếm bởi F.

57. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 56, với điều kiện là các vị trí H12, H17, H24, H43, H48, H83, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, A, Q, I, T, F.

58. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 24, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H12 bị chiếm bởi V, H24 bị chiếm bởi A, H48 bị chiếm bởi I, H67 bị chiếm bởi A, H80 bị chiếm bởi L, H83 bị chiếm bởi T, và H91 bị chiếm bởi F.

59. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 58, với điều kiện là các vị trí H12, H24, H48, H67, H80, H83, và H91 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, I, A, L, T, và F.

60. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 23, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VH bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: H10 bị chiếm bởi E hoặc D, H12 bị chiếm bởi K hoặc V, H13 bị chiếm bởi K hoặc R, H17 bị chiếm bởi T, L hoặc S, H24 bị chiếm bởi V hoặc A, H27 bị chiếm bởi F hoặc Y, H28 bị

chiếm bởi N hoặc T, H29 bị chiếm bởi I hoặc F, H30 bị chiếm bởi K hoặc T, H38 bị chiếm bởi Q hoặc R, H40 bị chiếm bởi A hoặc R, H42 bị chiếm bởi G hoặc E, H43 bị chiếm bởi K hoặc Q, H48 bị chiếm bởi M hoặc I, H51 bị chiếm bởi V hoặc I, H54 bị chiếm bởi N hoặc D, H60 bị chiếm bởi D hoặc A, H61 bị chiếm bởi P hoặc E, H66 bị chiếm bởi R hoặc K, H67 bị chiếm bởi V hoặc A, H76 bị chiếm bởi D hoặc N, H80 bị chiếm bởi M hoặc L, H81 bị chiếm bởi E hoặc Q, H82a bị chiếm bởi S hoặc G, H83 bị chiếm bởi T hoặc R, H91 bị chiếm bởi Y hoặc F, H93 bị chiếm bởi A hoặc S, H102 bị chiếm bởi F hoặc Y, H108 bị chiếm bởi T hoặc L, H109 bị chiếm bởi L hoặc V.

61. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H13, H17, H24, H38, H42, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, L, A, R, E, Q, I, K, A, N, L, Q, T, F, và S.

62. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H38, H42, H43, H76, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, E, Q, N, T, và S.

63. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H13, H17, H24, H38, H40, H42, H43, H48, H66, H67, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, L, A, R, R, E, Q, I, K, A, N, L, Q, G, T, F, và S.

64. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H24, H38, H40, H43, H48, H67, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, R, R, Q, I, A, L, Q, G, T, F, và S.

65. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H43, H48, H54, H60, H67, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, T, R, R, Q, I, D, A, A, L, Q, G, T, F, và S.

66. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H48, H51, H54, H60, H67, H80, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, T, R, R, I, V, D, A, A, L, G, T, F, và S.

67. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H24, H28, H38, H40, H48, H54, H60, H67, H80, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, A, T, R, R, I, D, A, A, L, G, T, F, và S.

68. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H13, H17, H24, H29, H38, H40, H42, H43, H54, H61, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, A, F, R, R, E, Q, N, E, N, L, Q, G, T, F, và S.

69. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60 với điều kiện là các vị trí H13, H17, H24, H27, H28, H29, H30, H38, H40, H42, H43, H51, H54, H60, H61, H76, H80, H81, H82A, H83, H91, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R, L, A, Y, T, F, T, R, R, E, Q, V, D, A, E, N, L, Q, G, T, F, và S.

70. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H10, H12, H17, H24, H28, H38, H40, H42, H43, H48, H54, H60, H61, H76, H80, H82A, H83, H91, H93, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, V, L, A, T, R, R, E, Q, I, N, A, E, N, L, G, T, F, S, T, và L.

71. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H10, H12, H17, H24, H28, H38, H40, H43, H48, H51, H54, H60, H61, H82A, H83, H91, H93, H102, H108, và H109 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi D, V, L, A, T, R, R, Q, I, V, D, A, E, G, T, F, S, Y, T, và L.

72. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H38 và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi R và S.

73. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H17, H27, H29, H38, H61, H76, H82A, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, F, R, E, N, G, và S.

74. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H17, H27, H28, H29, H30, H38, H51, H54, H60, H61, H76, H82A, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi L, Y, T, F, T, R, V, D, A, E, N, G, và S.

75. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H38, H40, H48, H66, H67, H76, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, R, R, I, K, A, N, L, G, T, và S.

76. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H17, H27, H29, H38, H40, H61, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, Y, F, R, R, E, L, G, T, và S.

77. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 60, với điều kiện là các vị trí H12, H17, H27, H28, H29, H30, H38, H40, H51, H54, H60, H61, H80, H82A, H83, và H93 trong vùng VH lần lượt bị chiếm bởi V, L, Y, T, F, T, R, R, V, D, A, E, L, G, T, và S.

78. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 23, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L36 bị chiếm bởi L, L37 bị chiếm bởi L, và L100 bị chiếm bởi G.

79. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 78, với điều kiện là các vị trí L36, L37, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L, và G.

80. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 78, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L12 bị chiếm bởi S và L45 bị chiếm bởi K.

81. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 80, với điều kiện là các vị trí L12 và L45 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S và K.

82. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 23, trong đó ít nhất một trong số các vị trí sau đây trong vùng VL bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: L2 là V hoặc I, L7 là S hoặc T, L12 là P hoặc S, L15 là L hoặc I, L36 là L, L37 là L, L45 là R hoặc K, L60 là D hoặc S, L100 là G.

83. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 82, với điều kiện là các vị trí L12, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi S, L, L, K, và G.

84. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 82, với điều kiện là các vị trí L36, L37, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L và G.

85. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 82, với điều kiện là các vị trí L36, L37, L60, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi L, L, S, và G.

86. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 82, với điều kiện là các vị trí L2, L7, L12, L15, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi I, T, S, I, L, L, K, và G.

87. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 82, với điều kiện là các vị trí L2, L7, L12, L15, L36, L37, L45, và L100 trong vùng VL lần lượt bị chiếm bởi V, S, P, L, L, L, R, và G.

88. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 23, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 95% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 15 đến SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 46 đến SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 95% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 20-23, ngoại trừ là vị trí H17 có thể là T hoặc S, và vị trí H20 có thể là I hoặc V.

89. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 88, trong đó kháng thể này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 98% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 15 đến SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 46 đến SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin đồng nhất ít nhất là 98% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 20 đến SEQ ID NO: 23, ngoại trừ là vị trí H17 có thể là T hoặc S, và vị trí H20 có thể là I hoặc V.

90. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 89, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ trong số các SEQ ID NO:15 đến SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO:46 đến SEQ ID NO: 57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:20 đến SEQ ID NO: 23.

91. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

92. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

93. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

94. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

95. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

96. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

97. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

98. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:16 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

99. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

100. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

101. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

102. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:17 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

103. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

104. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

105. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:18, vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

106. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:18 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

107. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:19 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

108. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:19 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

109. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:19 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

110. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:19 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

111. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

112. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

113. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

114. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:46 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

115. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

116. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

117. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

118. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:47 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

119. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

120. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

121. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

122. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:48 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

123. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:49 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

124. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:49 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

125. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:49 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

126. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:49 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

127. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

128. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

129. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

130. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:50 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

131. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

132. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

133. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

134. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:51 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

135. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

136. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

137. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

138. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:52 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

139. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

140. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

141. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

142. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:53 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

143. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

144. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

145. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

146. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:54 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

147. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

148. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 92, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

149. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

150. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:55 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

151. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

152. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

153. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

154. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:56 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

155. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:20.

156. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:21.

157. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

158. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 90, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:57 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của SEQ ID NO:23.

159. Kháng thể theo điểm 1 trong đó kháng thể này là kháng thể khảm.

160. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể được ngụy trang.

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

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

163. Kháng thể theo điểm 162, trong đó đoạn liên kết này là kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab, hoặc $F(ab')_2$.

164. Kháng thể theo điểm 1, trong đó isotyp này là IgG1 người.

165. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 15, 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.

166. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 165, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này là dạng đột biến của vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người mà có khả năng liên kết với thụ thể Fcγ giảm so với vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người.

167. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 166, trong đó vùng hằng định chuỗi nặng này là isotyp IgG1.

168. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này có ít nhất một đột biến trong vùng hằng định.

169. Kháng thể theo điểm 168, trong đó đột biến này làm giảm sự cố định hoặc hoạt hóa bổ thể bởi vùng hằng định.

170. Kháng thể theo điểm 169, 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.

171. Kháng thể theo điểm 170, trong đó kháng thể này có alanin ở các vị trí 318, 320 và 322.

172. Kháng thể theo điểm 1, trong đó isotyp là isotyp IgG2 hoặc IgG4 người.

173. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này tinh khiết ít nhất là 95% khối lượng/khối lượng.

174. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này 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.

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

176. Axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể theo điểm 1.

177. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic theo điểm 176.

178. Tế bào chủ được biến nạp bằng vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo điểm 177.

179. Phương pháp làm cho kháng thể chuột tương thích với người, trong đó phương pháp này bao gồm:

(a) chọn một hoặc nhiều trình tự 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 sản sinh 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.

180. Phương pháp tạo ra kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được ngụy trang theo điểm 3, trong đó phương pháp này bao gồm:

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

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

181. Phương pháp tạo ra dòng tế bào sản sinh kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được ngụy trang theo điểm 3, trong đó phương pháp này bao gồm:

(a) đưa vectơ 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 vectơ 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.

182. Phương pháp theo điểm 181, trong đó phương pháp này còn bao gồm nhân giống các tế bào này trong các điều kiện chọn lọc và sàng lọc các dòng tế bào biểu hiện và tiết tự nhiên ít nhất là 100 mg/L/10^6 tế bào/24 giờ.

183. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-L1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 36.

184. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-L2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:13 hoặc SEQ ID NO: 37.

185. Kháng thể theo điểm 1, trong đó CDR-L3 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:14 hoặc SEQ ID NO: 38.

186. Kháng thể theo điểm 5, trong đó CDR-H3 có trình tự axit amin LDY.

187. Kháng thể theo điểm 186, trong đó CDR-L1 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO:12 hoặc SEQ ID NO: 36.

188. Kháng thể theo điểm 186, trong đó CDR-L2 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 13 hoặc SEQ ID NO: 37.

189. Kháng thể theo điểm 186, trong đó CDR-L3 có trình tự axit amin chứa SEQ ID NO: 14 hoặc SEQ ID NO: 38.

190. Phương pháp tạo ra kháng thể cạnh tranh với kháng thể tham chiếu để liên kết với tau người bao gồm bước gây miễn dịch động vật hoặc tế bào B bằng chất sinh miễn dịch chứa tau người hoặc đoạn của nó bao gồm các gốc 257-271 hoặc 320-334 của trình tự SEQ ID NO:1 để tạo ra kháng thể, và tiến hành thử nghiệm cạnh tranh với các kháng thể được tạo ra, kháng thể tham chiếu, và tau người để nhận diện tập hợp con các kháng thể được tạo ra có tác dụng ức chế liên kết của kháng thể tham chiếu với tau người; trong đó kháng thể tham chiếu gồm 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.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Prothena Biosciences Ltd.

Barbour, Robin

Dolan, Philip J.

Liu, Yue

Alexander, Svetlana

Renz, Mark

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

<130> 057450-497107

<150> US 62/330,789

<151> 02-05-2016

<160> 73

<170> PatentIn version 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

Glu Pro Lys Lys Val Ala Val Val Arg Thr Pro Pro Lys Ser Pro Ser
195 200 205

Ser Ala Lys Ser Arg Leu Gln Thr Ala Pro Val Pro Met Pro Asp Leu
210 215 220

Lys Asn Val Lys Ser Lys Ile Gly Ser Thr Glu Asn Leu Lys His Gln
225 230 235 240

Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Ile Asn Lys Lys Leu Asp Leu Ser
245 250 255

Asn Val Gln Ser Lys Cys Gly Ser Lys Asp Asn Ile Lys His Val Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Ser Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser Lys
275 280 285

Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro Gly
290 295 300

Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp Arg
305 310 315 320

Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro Gly

325 330 335

Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu Asn

340 345 350

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

355 360 365

Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser Ser

370 375 380

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

385 390 395 400

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

405 410

<210> 3

<211> 383

<212> PRT

<213> 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
225 230 235 240
Pro Gly Gly Gly Lys Val Gln Ile Val Tyr Lys Pro Val Asp Leu Ser
245 250 255
Lys Val Thr Ser Lys Cys Gly Ser Leu Gly Asn Ile His His Lys Pro
260 265 270

Gly Gly Gly Gln Val Glu Val Lys Ser Glu Lys Leu Asp Phe Lys Asp
275 280 285
Arg Val Gln Ser Lys Ile Gly Ser Leu Asp Asn Ile Thr His Val Pro
290 295 300
Gly Gly Gly Asn Lys Lys Ile Glu Thr His Lys Leu Thr Phe Arg Glu
305 310 315 320
Asn Ala Lys Ala Lys Thr Asp His Gly Ala Glu Ile Val Tyr Lys Ser
325 330 335
Pro Val Val Ser Gly Asp Thr Ser Pro Arg His Leu Ser Asn Val Ser
340 345 350
Ser Thr Gly Ser Ile Asp Met Val Asp Ser Pro Gln Leu Ala Thr Leu
355 360 365
Ala Asp Glu Val Ser Ala Ser Leu Ala Lys Gln Gly Leu
370 375 380

<210> 6
<211> 352
<212> PRT
<213> 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> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 7

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

1 5 10 15

Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 8
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 8
Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 9
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 9
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 10
<400> 10
000
<210> 11
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 11
Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45

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

<210> 12
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 12
Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15
<210> 13
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 13
Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser
1 5
<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 14
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr Thr
1 5
<210> 15
<211> 112
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 15

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

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 16

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

<210> 17

<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 17

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

<210> 18
<211> 112
<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
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 19
<211> 112
<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
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Thr Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 20
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 20

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

85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 21

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 21

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 22

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 22

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Arg Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 23
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 23

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30

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

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 24
<211> 119
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 24

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

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

<210> 25
<211> 98
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 25
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
20 25 30
Tyr Met His Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45
Gly Leu Val Asp Pro Glu Asp Gly Glu Thr Ile Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Thr

<210> 26
<211> 13
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 26
Gln His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 27
<211> 100
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 27

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

<210> 28
<211> 12
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 28

Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 29
<211> 112
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 29

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

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

<210> 30
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 30
gaggttcagc tgcagcagtc tggggctgac cttgtgaggc caggggcctt agtcaagttg 60
tcctgcaaag cttctggctt caacattaaa gactactatt tgcactgggt gaggcagagg 120
cctgaacagg gcctggagtg gattggatgg attgatcctg agaatggtga tactgtatat 180
gacccgaagt tccagggcaa ggccactata acagcagaca catcctccaa tacagcctac 240
ctgcagctcg gcagcctgac atctgaggac actgccgtct atttctgttc tacccttgac 300
ttctggggcc aaggcaccac tctcacagtc tcctca 336

<210> 31
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 31
gatgttgtga tgacccagac tccactcact ttgtcggtta ccattggaca accagcctcc 60
atctcttgca agtcaagtca gagcctctta gatagtgatg gaaagacata tttgaattgg 120
ttgttacaga ggccaggcca gtctccaaag cgcctaatct atctggtgtc taaactggac 180
tctggagtcc ctgacaggtt cactggcagt ggatcaggga cagatttcac actgaaaatc 240
agcagagtgg aggctgagga tttgggagtt tattattgct ggcaaggtac acattttccg 300
tacacgttcg gaggggggac caagctggaa ataaaacgt 339

<210> 32
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 32
Asp Tyr Tyr Leu His

1 5

<210> 33

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 33

Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

1 5

<210> 34

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 34

Asp Pro Glu Asn Gly Asp

1 5

<210> 35

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 35

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val

1 5 10

<210> 36

<211> 7

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 36

Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu

1 5

<210> 37

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 37
Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp
1 5 10
<210> 38
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 38
Trp Gln Gly Thr His Phe Pro Tyr
1 5
<210> 39
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 39
Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5
<210> 40
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 40
Trp Ile Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val
1 5 10
<210> 41
<211> 4
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 41

Ser Thr Leu Asp
1
<210> 42
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 42
Gly Phe Thr Ile Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10
<210> 43
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 43
Trp Ile Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 44
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (13)..(13)
<223> Xaa = Arg hoặc Lys
<220>
<221> MISC_FEATURE
<222> (67)..(67)
<223> Xaa = Lys hoặc Arg
<400> 44
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Val Xaa Pro Gly Ala
1 5 10 15
Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr

20 25 30

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

35 40 45

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Xaa Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

100 105 110

<210> 45

<211> 113

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 45

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

1 5 10 15

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser

20 25 30

Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro

50 55 60

Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile

65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly

85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 46

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 46

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

<210> 47
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 47

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

<210> 48
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 48

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

Leu Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Phe Lys Asp Tyr
20 25 30

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

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

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

Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 49

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 49

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

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

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

Gly Trp Val Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Val Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95

Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 50

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 50

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

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

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

Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 51

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Được tổng hợp

<400> 51

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

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

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

Gly Trp Val Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Val Tyr Ala Glu Lys Phe
50 55 60

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

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

Ser Thr Leu Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 52

<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 52

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

<210> 53
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 53

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

100 105 110

<210> 54
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 54

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

<210> 55
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 55

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

85 90 95

Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
100 105 110

<210> 56
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 56

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

<210> 57
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 57

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

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

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 58
Gly Phe Asn Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 59
Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 60
Gly Tyr Asn Phe Lys Asp Tyr Tyr Leu His
1 5 10

<210> 61
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 61
Trp Val Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Val Tyr Ala Pro Lys Phe Gln

1 5 10 15
Gly

<210> 62
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 62
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 63
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 63
Trp Val Asp Pro Glu Asp Gly Asp Thr Val Tyr Ala Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 64
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 64
Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Ala Glu Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 65
<400> 65
000
<210> 66

<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 66

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

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 67

Gly Leu Asn Ile Lys Asp Tyr Tyr Ile His
1 5 10

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 68

Trp Ile Asp Pro Glu Asn Asp Asp Thr Glu Tyr Ala Pro Lys Phe Gln
1 5 10 15
Gly

<210> 69
<400> 69
000
<210> 70
<211> 114
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 70

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

<210> 71
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 71

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

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

<210> 72
<211> 442
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 72
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Asp Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15
Leu Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys Asp Tyr
20 25 30
Tyr Leu His Trp Val Arg Gln Arg Pro Glu Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45
Gly Trp Ile Asp Pro Glu Asn Gly Asp Thr Val Tyr Asp Pro Lys Phe
50 55 60
Gln Gly Lys Ala Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Ser Asn Thr Ala Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Leu Gly Ser Leu Thr Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
85 90 95
Ser Thr Leu Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
100 105 110
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
115 120 125
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
130 135 140
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
145 150 155 160
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
165 170 175
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
180 185 190
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
195 200 205
Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
210 215 220

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
225 230 235 240
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
245 250 255
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
260 265 270
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
275 280 285
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
290 295 300
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
305 310 315 320
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
325 330 335
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
340 345 350
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
355 360 365
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
370 375 380
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
385 390 395 400
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
405 410 415
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
420 425 430
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440

<210> 73
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
<220>
<223> Được tổng hợp
<400> 73

Asp Val Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Thr Leu Ser Val Thr Ile Gly
1 5 10 15
Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asp Ser
20 25 30
Asp Gly Lys Thr Tyr Leu Asn Trp Leu Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Arg Leu Ile Tyr Leu Val Ser Lys Leu Asp Ser Gly Val Pro
50 55 60

Asp Arg Phe Thr Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80

Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Leu Gly Val Tyr Tyr Cys Trp Gln Gly
85 90 95

Thr His Phe Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

1/9

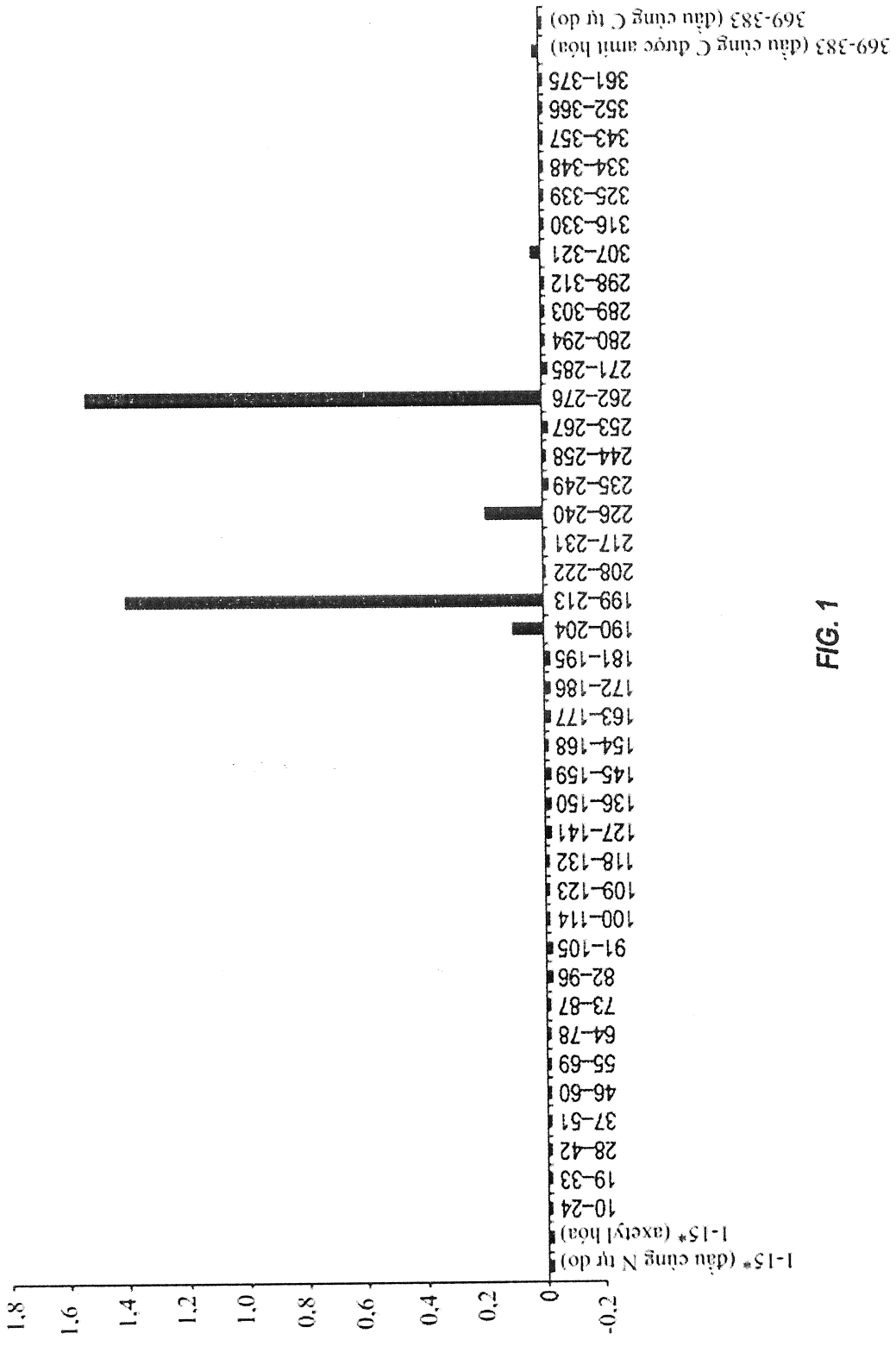

1-15* (đầu cùng N tự do)
1-15* (axetyl hóa)
10-24
19-33
28-42
37-51
46-60
55-69
64-78
73-87
82-96
91-105
100-114
109-123
118-132
127-141
136-150
145-159
154-168
163-177
172-186
181-195
190-204
199-213
208-222
217-231
226-240
235-249
244-258
253-267
262-276
271-285
280-294
289-303
298-312
307-321
316-330
325-339
334-348
343-357
352-366
361-375
369-383 (đầu cùng C dược amit hóa)
369-383 (đầu cùng C tự do)
1,8
1,6
1,4
1,2
1,0
0,8
0,6
0,4
0,2
0
-0,2

FIG. 1

Sắp xếp thẳng hàng VH

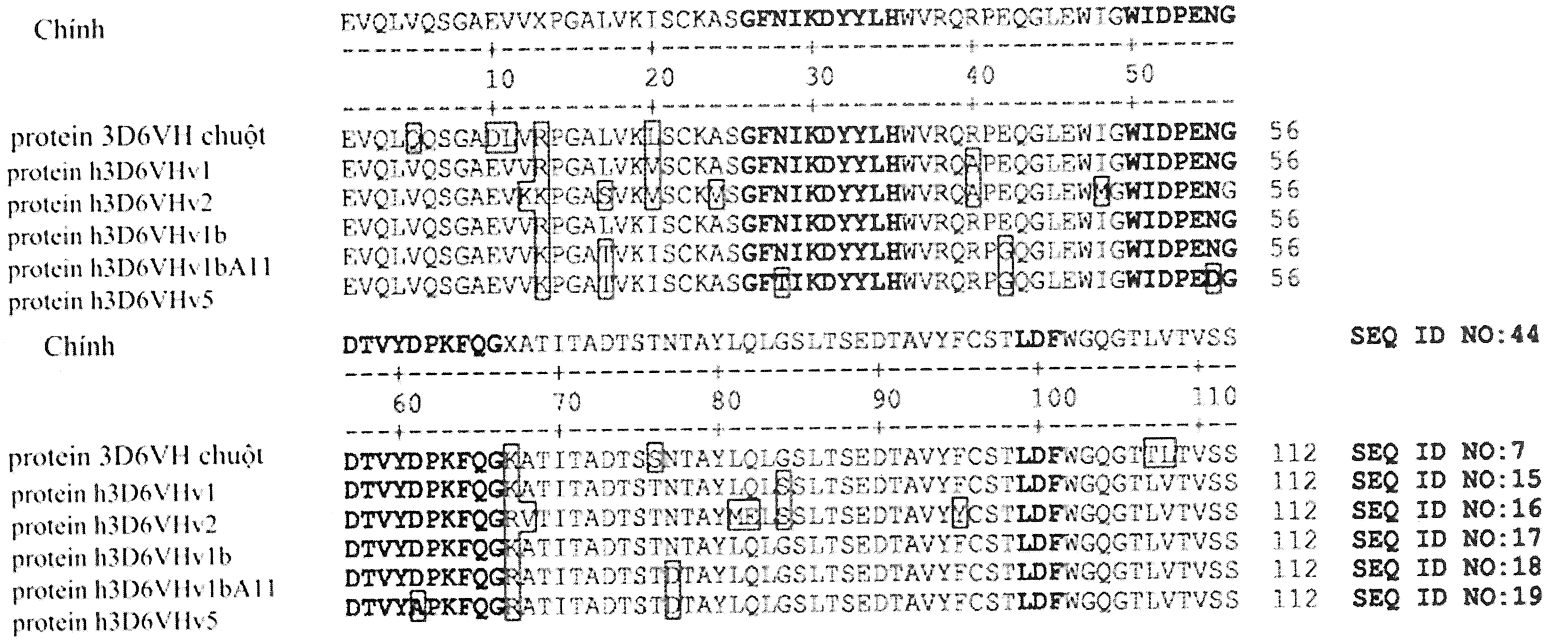


FIG. 2

Sắp xếp thẳng hàng VL

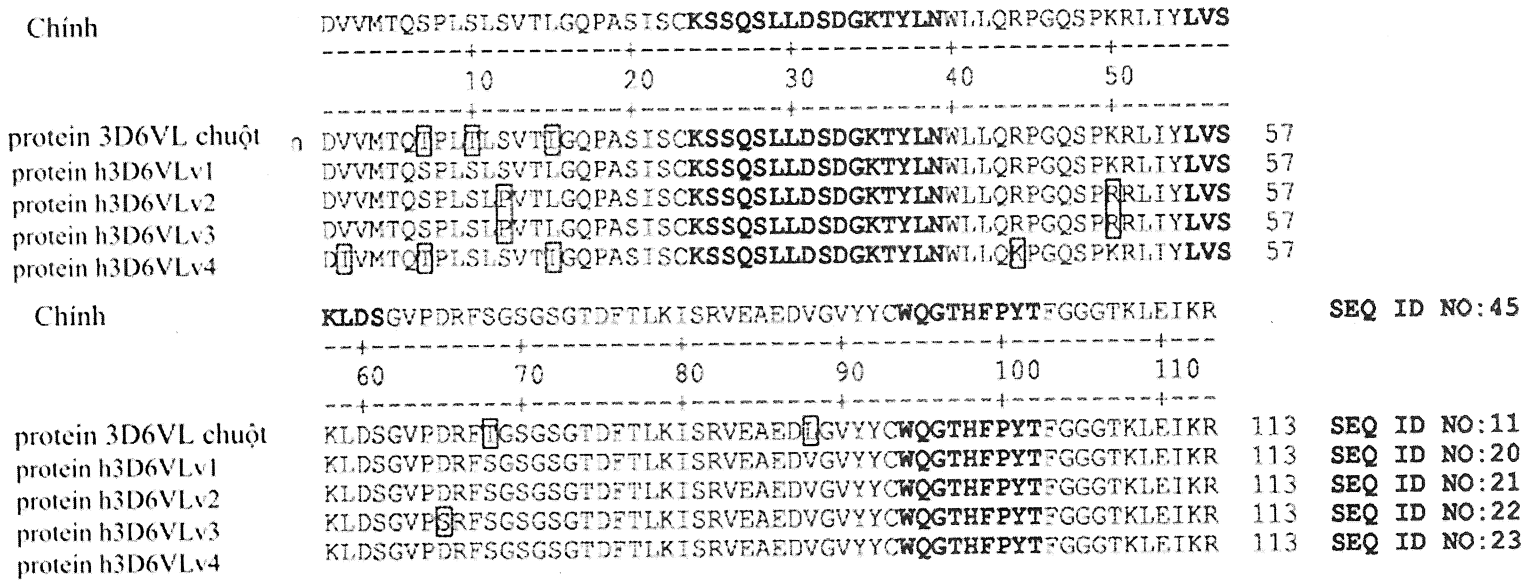


FIG. 3

Sắp xếp thẳng hàng VH

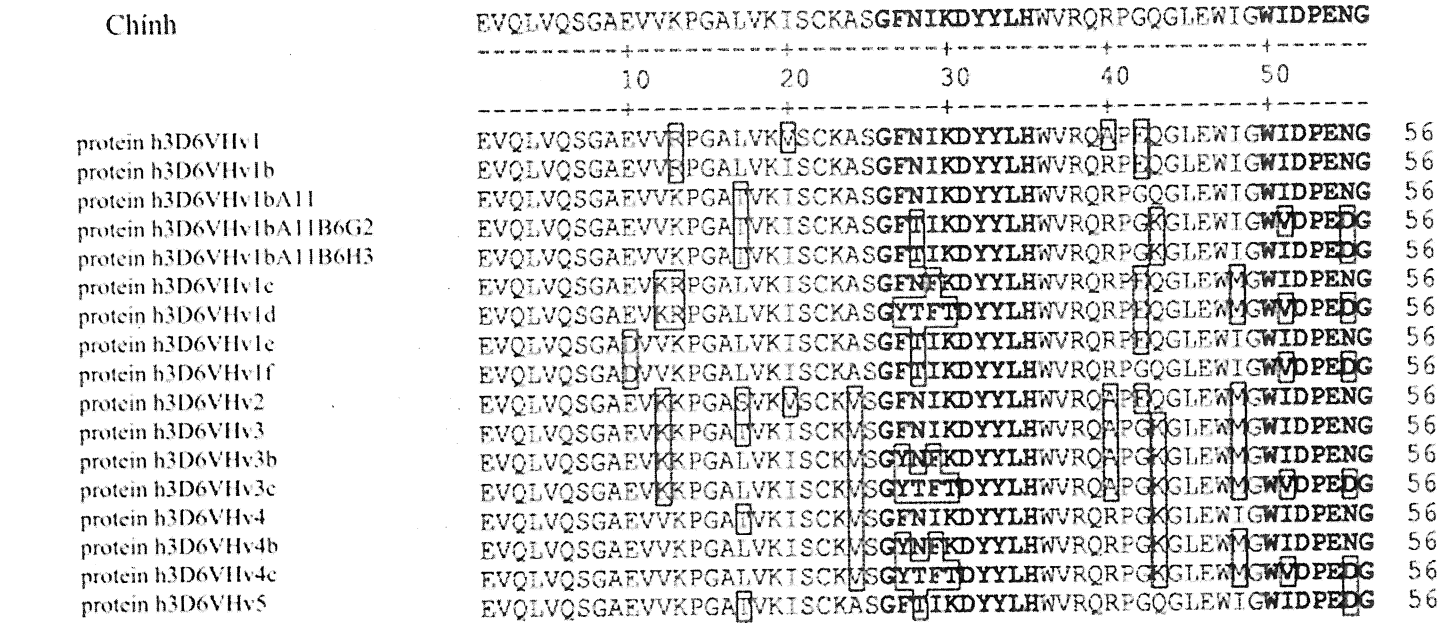


FIG. 4A

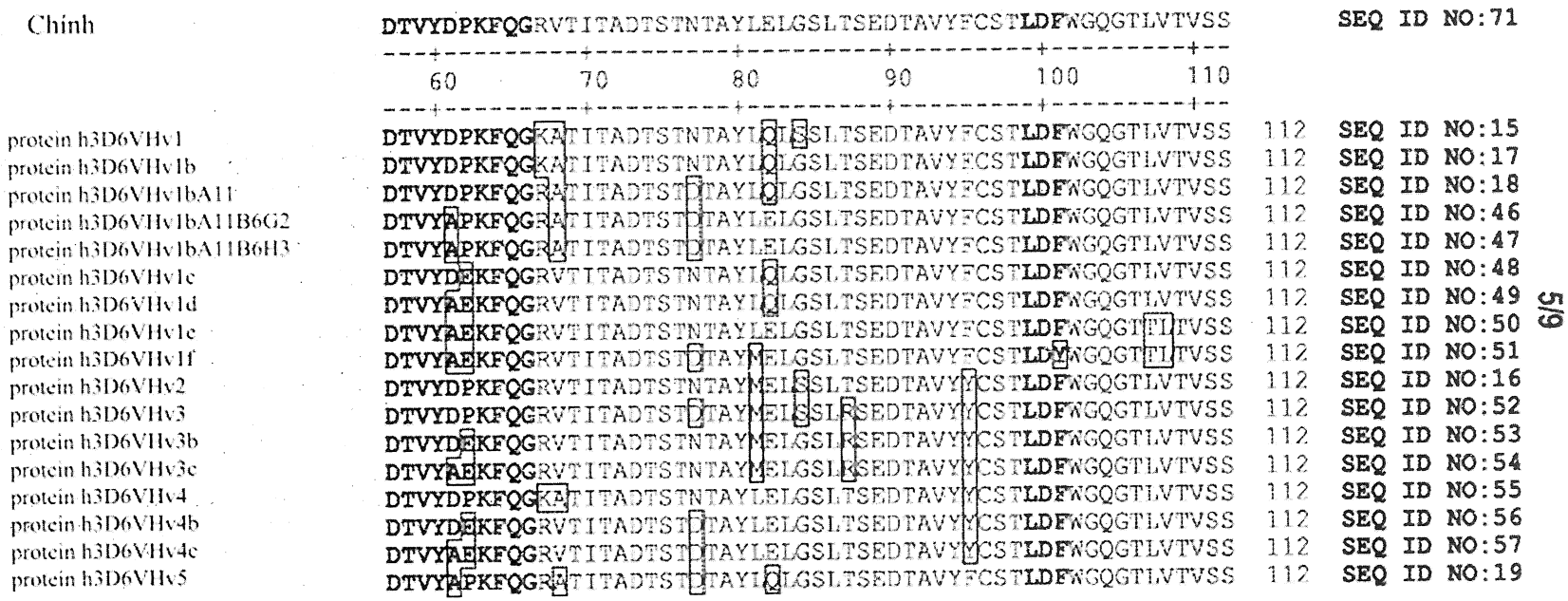

Chinh
DTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS SEQ ID NO:71
60 70 80 90 100 110
protein h3D6VHv1 DTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:15
protein h3D6VHv1b DTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:17
protein h3D6VHv1bA11 DTVYDPKFQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:18
protein h3D6VHv1bA11B6G2 DTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:46
protein h3D6VHv1bA11B6H3 DTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:47
protein h3D6VHv1c DTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:48
protein h3D6VHv1d DTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:49
protein h3D6VHv1e DTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYLELGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:50
protein h3D6VHv1f DTVYAEKFQGRVTITADTSTDTAYMELGSLTSEDTAVYFCSTLDYWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:51
protein h3D6VHv2 DTVYDPKFQGRVTITADTSTNTAYMELSSLTSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:16
protein h3D6VHv3 DTVYDPKFQGRVTITADTSTDTAYMELSSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:52
protein h3D6VHv3b DTVYDEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:53
protein h3D6VHv3c DTVYAEKFQGRVTITADTSTNTAYMELGSLRSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:54
protein h3D6VHv4 DTVYDPKFQGKATITADTSTNTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:55
protein h3D6VHv4b DTVYDEKFQGRVTITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:56
protein h3D6VHv4c DTVYAEKFQGRVTITADTSTDTAYLELGSLTSEDTAVYYCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:57
protein h3D6VHv5 DTVYAPKFQGRATITADTSTDTAYLQLGSLTSEDTAVYFCSTLDFWGQGTLVTVSS 112 SEQ ID NO:19

FIG. 4B

6/9

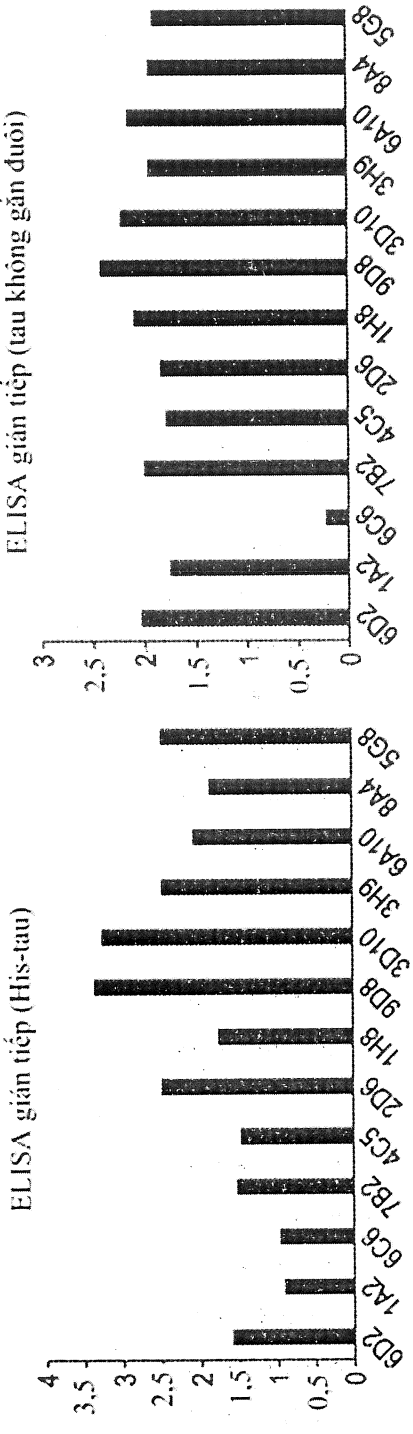


FIG. 5A

FIG. 5B

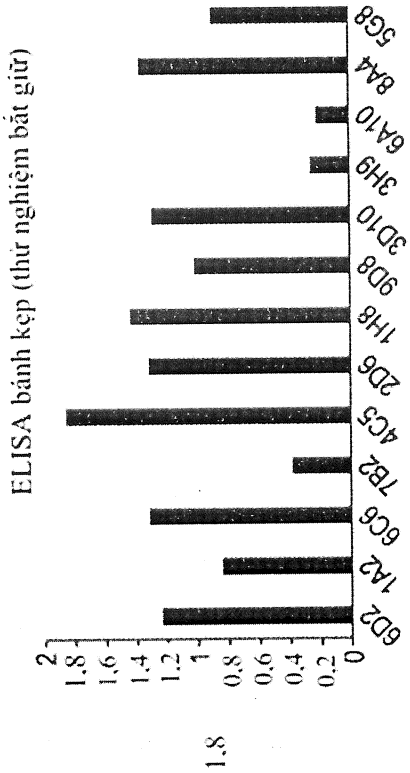


FIG. 5C

Tên	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	k_D (nM)
3D6	$2,58 \times 10^6$	$1,19 \times 10^{-3}$	0,46
1H8	$5,07 \times 10^5$	$5,61 \times 10^{-3}$	11,1
3H9	$4,71 \times 10^5$	$1,41 \times 10^{-3}$	3,0
5G8	$3,75 \times 10^5$	$2,54 \times 10^{-3}$	6,78
6D2	$3,83 \times 10^5$	$3,18 \times 10^{-3}$	8,29
7G6	$5,76 \times 10^5$	$3,32 \times 10^{-3}$	5,77
8A4	$5,99 \times 10^5$	$2,27 \times 10^{-3}$	3,8

FIG. 6

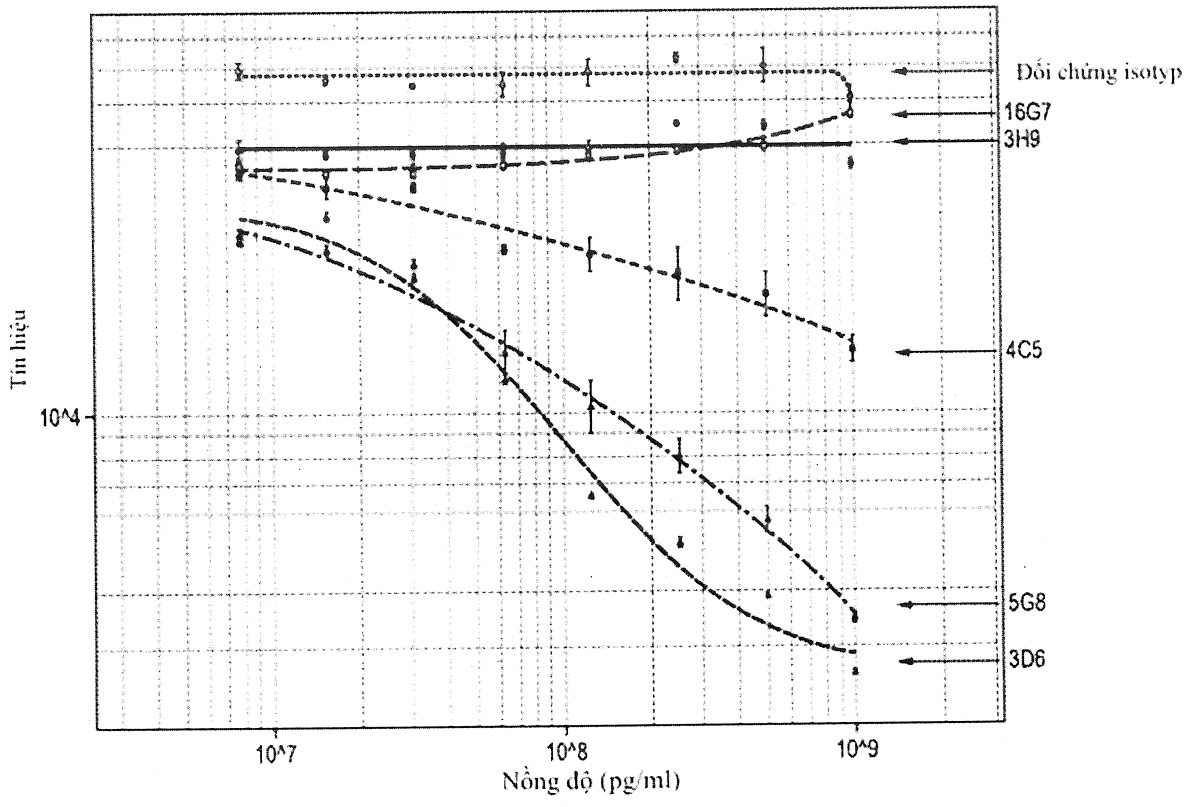


FIG. 7

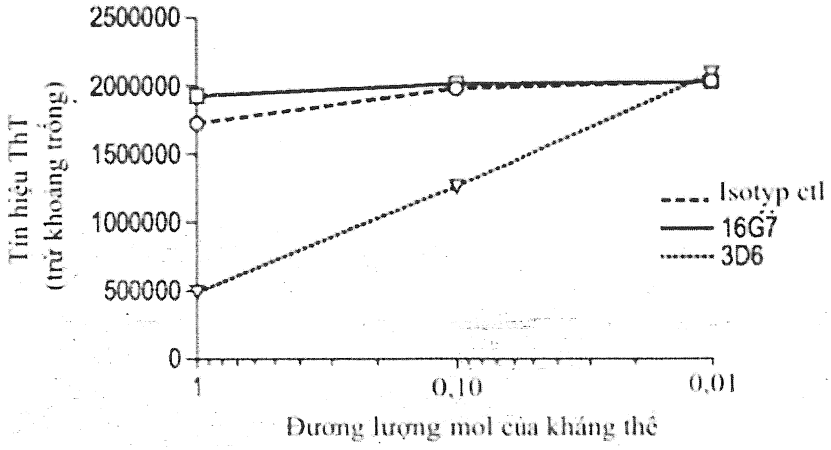

2500000
2000000
1500000
1000000
500000
0
Tín hiệu ThT
(trừ khoảng trống)
1
0,10
0,01
Đương lượng mol của kháng thể
Isotyp ctl
16G7
3D6

FIG. 8

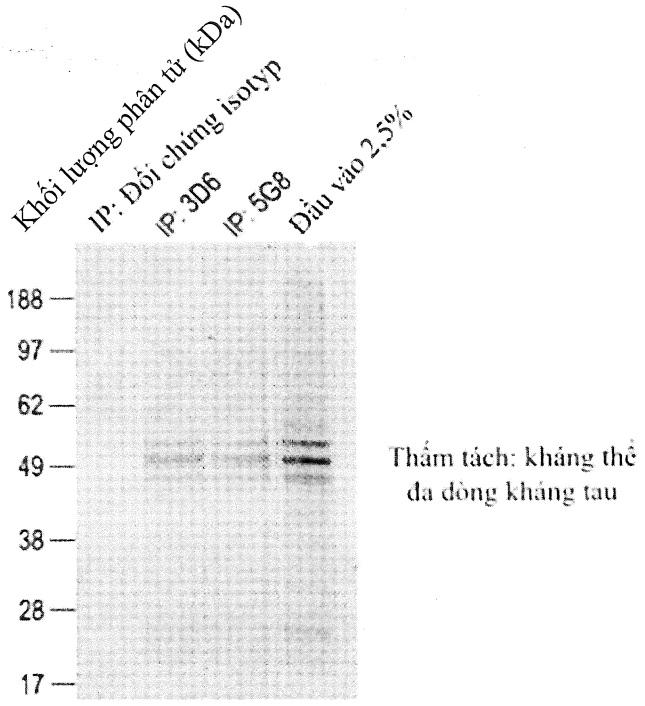

Khối lượng phân tử (kDa)
IP: Đối chứng isotyp
IP: 3D6
IP: 5G8
Đầu vào 2,5%
188
97
62
49
38
28
17
Thấm tách: kháng thể
đa dòng kháng tau

FIG. 9

9/9

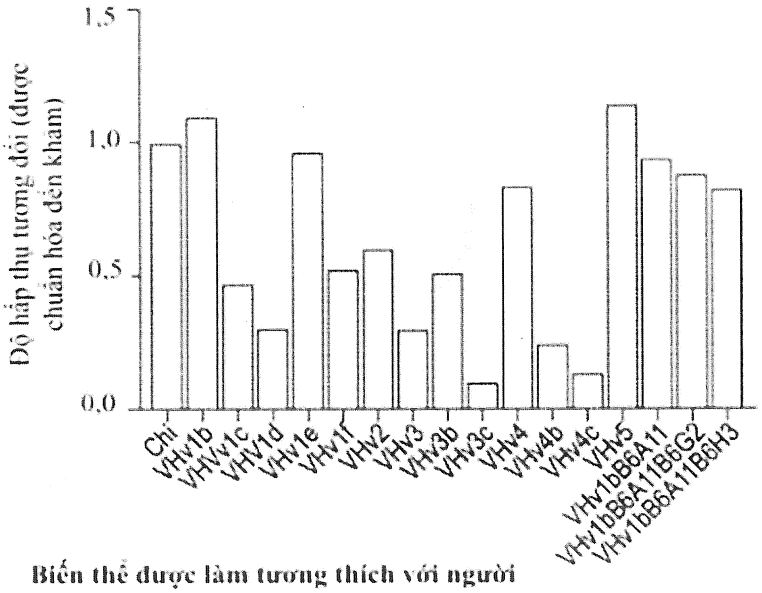


FIG. 10A

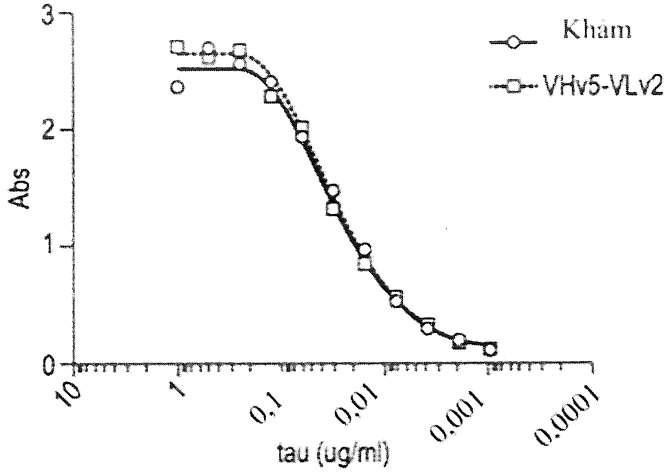


FIG. 10B

Tên	k_a ($M^{-1}s^{-1}$)	k_d (s^{-1})	k_D (nM)
h3D6-VHv5VLv2	$9{,}03 \times 10^{6}$	$9{,}14 \times 10^{-4}$	0,10

FIG. 10C