(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) **1-0049742**

(51)[7] **C07K 16/18**

(13) **B**

(21) 1-2017-03253
(22) 28/01/2016
(86) PCT/IB2016/050415 28/01/2016
(87) WO/2016/120810 04/08/2016
(30) 62/109,002 28/01/2015 US; 62/266,556 11/12/2015 US
(45) 25/08/2025 449
(43) 27/11/2017 356A
(73) 1. NOVO NORDISK A/S (DK)
Novo Alle' 1, 2880 Bagsvaerd, Denmark
2. UNIVERSITY HEALTH NETWORK (CA)
190 Elizabeth Street, R. Fraser Elliott Building, Room 1S-417, Toronto, Ontario M5G 2C4, Canada
(72) LIU, Yue (US); NIJJAR, Tarlochan S. (US); CHAKRABARTTY, Avijit (CA); HIGAKI, Jeffrey N. (US).
(74) Công ty TNHH Quốc tế D &N (D&N INTERNATIONAL CO.,LTD.)

(54) KHÁNG THỂ LIÊN KẾT VỚI TRANSTHYRETIN, AXIT NUCLEIC MÃ HÓA KHÁNG THỂ, VECTƠ, TẾ BÀO CHỦ, DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA DÒNG TẾ BÀO SẢN SINH KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2017-03253

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với transthyretin (TTR). Kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tích lũy TTR hoặc tích lũy các lắng đọng TTR (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR). Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR, trong số các ứng dụng khác. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể, vectơ, tế bào chủ, dược phẩm chứa kháng thể và phương pháp sản xuất kháng thể này.

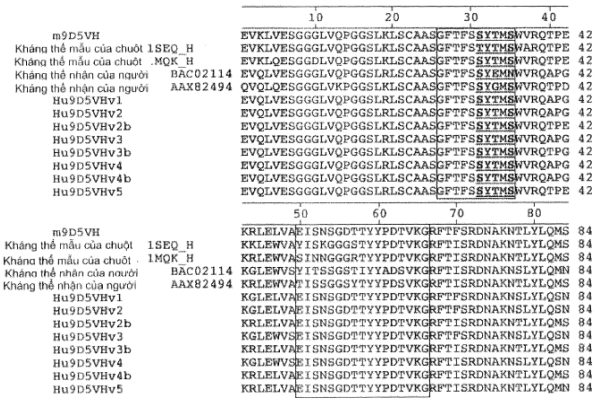


FIG. 1A.1

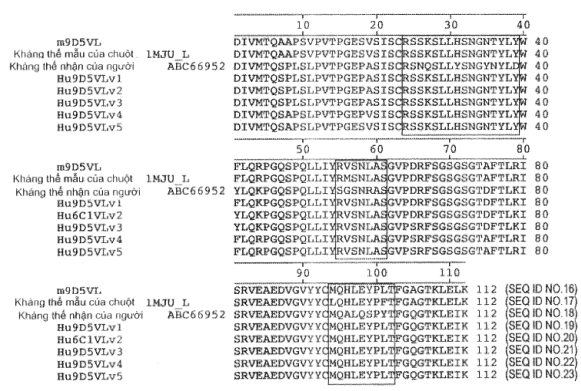


FIG. 1B

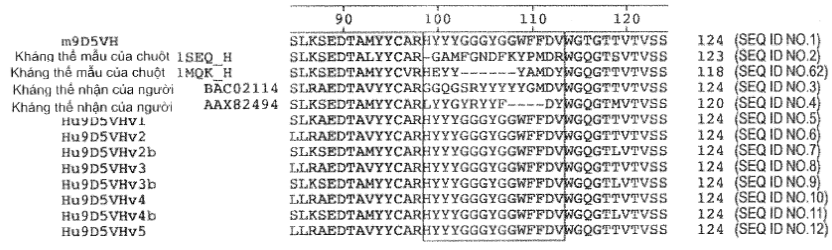


FIG. 1A.2

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể liên kết đặc hiệu với transthyretin (TTR). Kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tích lũy TTR hoặc tích lũy các lắng đọng TTR (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do TTR). Kháng thể này cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột do TTR và ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR, trong số các ứng dụng khác. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến axit nucleic mã hóa kháng thể, vectơ, tế bào chủ, dược phẩm chứa kháng thể và phương pháp sản xuất kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

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

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

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể liên kết với transthyretin và chứa ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ chủ yếu là của kháng thể 14G8. Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat và ba CDR chuỗi nhẹ Kabat của kháng thể 14G8, ngoại trừ mỗi vị trí H52 và L26 có thể là N hoặc S. Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat và ba CDR chuỗi nhẹ Kabat của kháng thể 14G8. Tùy ý, CDR-H1 là CDR liên hợp Kabat-

Chothia của kháng thể 14G8. Một số kháng thể chứa ba CDR chuỗi nặng Kabat của kháng thể 9D5. Tùy ý, CDR-H1 là CDR liên hợp Kabat-Chothia của kháng thể 9D5.

Một số kháng thể liên kết với cùng một epitop trên transthyretin với 9D5 hoặc 14G8 và chứa ba CDR chuỗi nhẹ và ba CDR chuỗi nặng, trong đó: (a) mỗi CDR có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90% với CDR tương ứng từ vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của 9D5; hoặc (b) mỗi CDR có sự tương đồng trình tự ít nhất là 90% với CDR tương ứng từ vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của 14G8, ngoại trừ vị trí L26 có thể là N hoặc S. Một số kháng thể chứa: (a) ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của 9D5; hoặc (b) ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của 14G8, ngoại trừ vị trí L26 có thể là N hoặc S. Trong một số kháng thể, ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của 9D5 có trình tự lần lượt nêu trong SEQ ID NO: 13 đến SEQ ID NO: 15 và SEQ ID NO: 24 đến SEQ ID NO: 26. Trong một số kháng thể, ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của 14G8 lần lượt có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67 đến SEQ ID NO: 69 và SEQ ID NO: 77 đến SEQ ID NO: 79, ngoại trừ vị trí L26 có thể là N hoặc S.

Bất kỳ trong số các kháng thể trên đây có thể là kháng thể đơn dòng. Bất kỳ trong số các kháng thể trên đây có thể là kháng thể khảm, được làm tương thích với người, được ngụy trang, hoặc kháng thể người. Bất kỳ trong số các kháng thể trên đây có thể có isotyp IgG1 của người, isotyp IgG2 của người, hoặc isotyp IgG4 của người.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể khảm hoặc kháng thể được làm tương thích với người của kháng thể chuột mà liên kết đặc hiệu với transthyretin, trong đó kháng thể chuột này được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 61 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 70, ngoại trừ vị trí H52 có thể là S hoặc N, vị trí H69 có thể là F hoặc I, vị trí L26 có thể là S hoặc N, và R ở vị trí L107 là tùy ý. Tùy ý, các kháng thể này là kháng thể 9D5 hoặc 14G8 được làm tương thích với người hoặc khảm mà liên kết đặc hiệu với transthyretin, trong đó 9D5 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 16, và 14G8 là kháng thể chuột được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 61 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 70. Tùy ý, kháng thể được làm tương thích với người này chứa: (a) vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng của 9D5 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ

trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 9D5; hoặc (b) vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nặng của 14G8 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người chứa ba CDR chuỗi nhẹ của 14G8, ngoại trừ vị trí L26 có thể là N hoặc S. Tùy ý, ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của 9D5 lần lượt là các SEQ ID NO: 13-15 và 24-26. Tùy ý, ba CDR chuỗi nặng và ba CDR chuỗi nhẹ của 14G8 lần lượt là các SEQ ID NO: 67-69 và 77-79, ngoại trừ vị trí L26 có thể là N hoặc S. Tùy ý, các khác biệt bất kỳ trong các CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành từ các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 16, lần lượt nằm ở các vị trí H60-H65. Tùy ý, khác biệt bất kỳ trong các CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành từ trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61 và SEQ ID NO: 70 lần lượt nằm ở các vị trí H60-H65, ngoại trừ vị trí L26 có thể là N hoặc S.

Tùy ý, kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23, ngoại trừ vị trí H19 có thể là R hoặc K, vị trí H40 có thể là A hoặc T, vị trí H44 có thể là G hoặc R, vị trí H49 có thể là S hoặc A, vị trí H77 có thể là S hoặc T, vị trí H82a có thể là N hoặc S, vị trí H83 có thể là R hoặc K, vị trí H84 có thể là A hoặc S, và vị trí H89 có thể là V hoặc M. Tùy ý, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: vị trí H42 bị chiếm bởi E, vị trí H47 bị chiếm bởi L, vị trí H69 bị chiếm bởi F, vị trí H82 bị chiếm bởi S, vị trí H82b bị chiếm bởi L, vị trí H108 bị chiếm bởi L, vị trí L8 bị chiếm bởi A, vị trí L9 bị chiếm bởi P, vị trí L18 bị chiếm bởi S, vị trí L19 bị chiếm bởi V, vị trí L36 bị chiếm bởi F, vị trí L39 bị chiếm bởi R, vị trí L60 bị chiếm bởi S, vị trí L70 bị chiếm bởi A, và vị trí L74 bị chiếm bởi R. Tùy ý, các vị trí H47, H69, và H82 lần lượt bị chiếm bởi L, F, và S. Tùy ý, các vị trí H47, H69, H82, và H82b lần lượt bị chiếm bởi L, F, S, và L. Tùy ý, các vị trí H42, H47, và H108 lần lượt bị chiếm bởi E, L, và L. Tùy ý, các vị trí H69, H82, và H82b lần lượt bị chiếm bởi F, S, và L. Tùy ý, mỗi vị trí H47 và H108 bị chiếm bởi L. Tùy ý, các vị trí H82 và H82b lần lượt bị chiếm bởi S và L. Tùy ý, các vị trí H42, H47, và H82b lần lượt bị chiếm bởi E, L, và L. Tùy ý, vị trí L36 bị chiếm bởi F. Tùy ý, vị trí L60 bị chiếm bởi S. Tùy ý, các vị trí

L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70, và L74 lần lượt bị chiếm bởi A, P, V, F, R, S, A, và R. Tùy ý, các vị trí L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70, và L74 lần lượt bị chiếm bởi A, P, S, V, F, R, S, A, và R.

Tùy ý, kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23, ngoại trừ vị trí H19 có thể là R hoặc K, vị trí H40 có thể là A hoặc T, vị trí H44 có thể là G hoặc R, vị trí H49 có thể là S hoặc A, vị trí H77 có thể là S hoặc T, vị trí H82a có thể là N hoặc S, vị trí H83 có thể là R hoặc K, vị trí H84 có thể là A hoặc S, và vị trí H89 có thể là V hoặc M. Tùy ý, kháng thể được làm tương thích với người này chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23, ngoại trừ vị trí H19 có thể là R hoặc K, vị trí H40 có thể là A hoặc T, vị trí H44 có thể là G hoặc R, vị trí H49 có thể là S hoặc A, vị trí H77 có thể là S hoặc T, vị trí H82a có thể là N hoặc S, vị trí H83 có thể là R hoặc K, vị trí H84 có thể là A hoặc S, và vị trí H89 có thể là V hoặc M. Tùy ý, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19.

Tùy ý, kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76, ngoại trừ vị trí H82a có thể là N hoặc S, vị trí H83 có thể là R hoặc K, vị trí H84 có thể là A hoặc S, vị trí H89 có thể là V hoặc M, và vị trí L18 có thể là S hoặc P. Tùy ý, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như

được xác định là: vị trí H1 bị chiếm bởi E, vị trí H47 bị chiếm bởi L, và vị trí L36 bị chiếm bởi F. Tùy ý, các vị trí H1 và H47 lần lượt bị chiếm bởi E và L. Tùy ý, vị trí L36 bị chiếm bởi F. Tùy ý, ít nhất một trong số các vị trí sau đây bị chiếm bởi axit amin như được xác định là: vị trí H3 bị chiếm bởi K, vị trí H105 bị chiếm bởi T, vị trí L8 bị chiếm bởi A, vị trí L9 bị chiếm bởi P, vị trí L19 bị chiếm bởi V, vị trí L26 bị chiếm bởi S, vị trí L60 bị chiếm bởi S, và vị trí L70 bị chiếm bởi A. Tùy ý, các vị trí H3 và H105 lần lượt bị chiếm bởi K và T. Tùy ý, các vị trí L8, L9, L19, và L70 lần lượt bị chiếm bởi A, P, V, và A. Tùy ý, mỗi vị trí L26 và L60 bị chiếm bởi S.

Tùy ý, kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 95% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76, ngoại trừ vị trí H82a có thể là N hoặc S, vị trí H83 có thể là R hoặc K, vị trí H84 có thể là A hoặc S, vị trí H89 có thể là V hoặc M, và vị trí L18 có thể là S hoặc P. Tùy ý, kháng thể được làm tương thích với người chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 98% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76, ngoại trừ vị trí H82a có thể là N hoặc S, vị trí H83 có thể là R hoặc K, vị trí H84 có thể là A hoặc S, vị trí H89 có thể là V hoặc M, và vị trí L18 có thể là S hoặc P. Tùy ý, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành này có trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76. Trong một số kháng thể, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76.

Bất kỳ trong số các kháng thể trên đây có thể là kháng thể nguyên vẹn, đoạn liên kết, kháng thể mạch đơn, đoạn Fab, hoặc đoạn Fab'2. Trong kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây, vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có thể được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có thể được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng. Tùy ý, vùng hằng định chuỗi nặng này là dạng đột biến của vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người có khả năng liên kết với thụ thể Fcγ bị giảm

so với vùng hằng định chuỗi nặng tự nhiên của người này. Tùy ý, vùng hằng định chuỗi nặng này là isotyp IgG1. Tùy ý, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 103 và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 104 hoặc SEQ ID NO: 105.

Sáng chế còn đề xuất dược phẩm chứa bất kỳ trong số các kháng thể trên đây và chất mang dược dụng.

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây, chẳng hạn như bất kỳ một trong số các SEQ ID NO: 40, 42, 44-56, 87, 89, 91-96, và 106-108.

Sáng chế còn đề xuất vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic như được mô tả trên đây, và tế bào chủ được biến nạp với vectơ biểu hiện tái tổ hợp này.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp làm cho kháng thể tương thích với người, phương pháp này bao gồm: (a) chọn một hoặc nhiều kháng thể nhận; (b) nhận diện các gốc axit amin của kháng thể chuột để giữ lại; (c) tổng hợp axit nucleic mã hóa chuỗi nặng được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nặng kháng thể chuột và axit nucleic mã hóa chuỗi nhẹ được làm tương thích với người chứa các CDR của chuỗi nhẹ kháng thể chuột; và (d) biểu hiện các axit nucleic này trong tế bào chủ để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người; trong đó kháng thể chuột này là 9D5 hoặc 14G8, trong đó 9D5 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 16, và 14G8 được đặc trưng bởi vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 61 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành nêu trong SEQ ID NO: 70.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp sản sinh kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được ngụy trang, phương pháp này bao gồm: (a) nuôi cấy tế bào đã được biến nạp axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, để tế bào này tiết ra kháng thể này; và (b) tinh chế kháng thể từ môi trường nuôi cấy tế bào; trong đó kháng thể này là dạng được làm tương thích với người, dạng khảm, hoặc dạng được ngụy trang của 9D5 hoặc 14G8.

Sáng chế còn đề xuất 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, 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 tế bào; (b) nhân giống tế bào này trong các điều kiện để chọn lọc 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 được chọn lọc dựa trên hiệu suất kháng thể; trong đó kháng thể này là dạng được làm tương thích với người, dạng khảm hoặc dạng được ngụy trang của 9D5 hoặc 14G8. Tùy ý, phương pháp này còn bao gồm bước nhân giống tế bào này trong các điều kiện chọn lọc và sàng lọc các dòng tế bào biểu hiện và tiết theo cách tự nhiên ít nhất là 100 mg/L/10^6 tế bào/24giờ.

Sáng chế còn mô tả phương pháp ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ transthyretin ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây, nhờ đó ức chế hoặc làm giảm sự kết tụ transthyretin ở đối tượng này.

Sáng chế còn mô tả phương pháp ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi transthyretin ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây, nhờ đó ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ transthyretin ở đối tượng này.

Sáng chế còn mô tả phương pháp làm giảm sự lắng đọng transthyretin ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây, nhờ đó làm giảm sự lắng đọng transthyretin ở đối tượng này.

Sáng chế còn mô tả phương pháp loại bỏ transthyretin đã kết tụ ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây, nhờ đó loại bỏ được transthyretin đã kết tụ khỏi đối tượng này so với đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin mà không nhận được kháng thể này.

Sáng chế còn mô tả phương pháp ổn định cấu hình không độc của transthyretin ở đối tượng mắc hoặc có nguy cơ phát triển bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số

các kháng thể trên đây, nhờ đó làm ổn định cấu hình không độc của transthyretin ở đối tượng này.

Sáng chế còn mô tả phương pháp điều trị hoặc phòng ngừa hữu hiệu bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây.

Sáng chế còn mô tả phương pháp trì hoãn sự phát bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng cho đối tượng này phác đồ hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây.

Sáng chế còn mô tả phương pháp chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước cho mẫu sinh học của đối tượng này tiếp xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây. Tùy ý, phương pháp này bao gồm thêm bước phát hiện sự liên kết của kháng thể với transthyretin, trong đó sự có mặt của kháng thể đã liên kết chỉ ra là đối tượng này mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin. Tùy ý, phương pháp này bao gồm thêm bước so sánh khả năng liên kết của kháng thể với mẫu sinh học này với khả năng liên kết của kháng thể này với mẫu đối chứng, do đó khả năng liên kết của kháng thể với mẫu sinh học này tăng lên so với mẫu đối chứng chỉ ra là đối tượng này mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin. Tùy ý, mẫu sinh học này và mẫu đối chứng này chứa tế bào có cùng nguồn gốc mô. Tùy ý, mẫu sinh học này và/hoặc mẫu đối chứng này là máu, huyết thanh, huyết tương, hoặc mô rắn. Tùy ý, mô rắn này là từ tim, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thần kinh thực vật, thận, mắt, hoặc đường tiêu hóa.

Trong bất kỳ trong số các phương pháp trên đây, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin có thể tùy ý là bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin có tính gia đình hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin đơn phát. Tùy ý, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin có tính gia đình là bệnh cơ tim dạng tinh bột có tính gia đình (familial amyloid cardiomyopathy - FAC), bệnh viêm đa dây thần kinh do dạng tinh bột có tính gia đình (familial amyloid polyneuropathy - FAP), hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (central nervous system selective amyloidosis - CNSA). Tùy ý, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin đơn phát này là bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già (senile systemic amyloidosis - SSA) hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột tim do tuổi già (senile cardiac amyloidosis - SCA). Trong bất kỳ trong số các

phương pháp trên đây, bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin có thể tùy ý kèm theo tích tụ dạng tinh bột ở tim, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thần kinh thực vật, thận, mắt, hoặc đường tiêu hóa của đối tượng.

Sáng chế còn mô tả phương pháp phát hiện sự có hoặc không có các lắng đọng transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước cho mẫu sinh học của đối tượng bị nghi ngờ có tích tụ dạng tinh bột tiếp xúc với lượng hữu hiệu của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây. Tùy ý, phương pháp này bao gồm thêm bước phát hiện sự liên kết của kháng thể với transthyretin, trong đó việc phát hiện ra kháng thể đã liên kết chỉ ra sự có mặt của các lắng đọng transthyretin. Tùy ý, phương pháp này bao gồm thêm bước so sánh khả năng liên kết của kháng thể với mẫu sinh học này với khả năng liên kết của kháng thể này với mẫu đối chứng, do đó khả năng liên kết của kháng thể với mẫu sinh học này tăng lên so với mẫu đối chứng chỉ ra rằng đối tượng này mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin. Tùy ý, mẫu sinh học này và mẫu đối chứng này chứa tế bào có cùng nguồn gốc mô. Tùy ý, mẫu sinh học này và/hoặc mẫu đối chứng này là máu, huyết thanh, huyết tương, hoặc mô rắn. Tùy ý, mô rắn này là từ tim, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thần kinh thực vật, thận, mắt, hoặc đường tiêu hóa.

Sáng chế còn mô tả phương pháp xác định mức lắng đọng transthyretin ở đối tượng, bao gồm bước sử dụng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể trên đây và phát hiện sự có mặt của kháng thể đã liên kết ở đối tượng này. Tùy ý, sự có mặt của kháng thể đã liên kết được xác định bằng kỹ thuật chụp cắt lớp phát xạ positron (positron emission tomograpgy - PET).

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A mô tả sự canh thẳng trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 của chuột, kháng thể mẫu của chuột, kháng thể nhận của người, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 9D5. Các CDR như được xác định bởi Kabat được đóng khung, ngoại trừ khung đầu tiên là liên hợp của Chothia CDR-H1 và Kabat CDR-H1, với Kabat CDR-H1 được gạch chân và in đậm.

Fig.1B mô tả sự canh thẳng trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 của chuột, kháng thể mẫu của chuột, kháng thể nhận của người, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 9D5. Các CDR như được xác định bởi Kabat được đóng khung.

Fig.2A mô tả sự canh thẳng trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 của chuột, kháng thể mẫu của chuột, kháng thể nhận của người, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 14G8. Các CDR như được xác định bởi Kabat được đóng khung, ngoại trừ khung đầu tiên là thể liên hợp của Chothia CDR-H1 và Kabat CDR-H1, với Kabat CDR-H1 được gạch chân và in đậm.

Fig.2B mô tả sự canh thẳng trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 của chuột, kháng thể mẫu của chuột, kháng thể nhận của người, và các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 14G8. Các CDR như được xác định bởi Kabat được đóng khung.

Fig.3A & Fig.3B: Fig.3A mô tả đường cong liên kết của kháng thể 5A1, 6C1, 9D5, và 14G8 của chuột với TTR được xử lý bằng độ pH=4. Fig.3B mô tả đường cong liên kết của kháng thể 5A1, 6C1, 9D5, và 14G8 chuột với TTR tự nhiên.

Fig.4A, Fig.4B & Fig.4C: Fig.4A mô tả tác dụng ức chế sự tạo sợi TTR-Y78F bởi các kháng thể TTR-lỗi. Fig.4B mô tả tác dụng ức chế sự tạo sợi TTR-V122I bởi 14G8. Fig.4C mô tả tác dụng ức chế sự tạo sợi TTR-V122I bởi kháng thể đối chứng.

Fig.5A & Fig.5B: Fig.5A mô tả phân tích đo tỷ trọng của phân tích thẩm tách Western các mẫu huyết tương của các người bệnh đã được xác nhận về V30M ATTR (Mẫu #21, #22, #23, #24, #25, và #27) và các mẫu từ đối tượng bình thường (Mẫu #11, #12, #15, #18, #19, #20) bằng cách sử dụng kháng thể 9D5 TTR-lỗi. Fig.5B mô tả phân tích đo tỷ trọng của phân tích thẩm tách Western cùng các mẫu này bằng cách sử dụng kháng thể 5A1 TTR-lỗi.

Fig.6 mô tả thử nghiệm đĩa MesoScale Discovery (MSD) của các mẫu huyết tương từ người bệnh đã được xác nhận về V30M ATTR (Mẫu #21, #22, #23, #24, #25, #27) và mẫu từ các đối tượng bình thường (#11, #12, #15, #18, #19, #20) bằng cách sử dụng kháng thể 6C1.

Fig.7A & Fig.7B: Fig.7A mô tả tác dụng của kháng thể 14G8 trên sự hấp thu F87M/L110M TTR bởi tế bào THP-1. Fig.7B mô tả tác dụng của mỗi kháng thể TTR-lỗi trên sự hấp thu V30M TTR bởi tế bào THP-1.

Mô tả vắn tắt các trình tự

SEQ ID NO: 1 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 2 thể hiện trình tự axit amin của khuôn cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nặng của chuột 1SEQ_H.

SEQ ID NO: 3 thể hiện trình tự axit amin của kháng thể nhận biến đổi chuỗi nặng ACC# BAC02114.

SEQ ID NO: 4 thể hiện trình tự axit amin của kháng thể nhận biến đổi chuỗi nặng ACC#AAX82494.1.

SEQ ID NO: 5 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 1 (Hu9D5VHv1).

SEQ ID NO: 6 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2 (Hu9D5VHv2).

SEQ ID NO: 7 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2b (Hu9D5VHv2b).

SEQ ID NO: 8 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu9D5VHv3).

SEQ ID NO: 9 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3b (Hu9D5VHv3b).

SEQ ID NO: 10 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4 (Hu9D5VHv4).

SEQ ID NO: 11 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4b (Hu9D5VHv4b).

SEQ ID NO: 12 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 5 (Hu9D5VHv5).

SEQ ID NO: 13 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-H1 của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 14 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-H2 của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 15 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-H3 của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 16 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 17 thể hiện trình tự axit amin của khuôn cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chuột 1MJU_L.

SEQ ID NO: 18 thể hiện trình tự axit amin của kháng thể nhận biến đổi chuỗi nhẹ ACC# ABC66952.

SEQ ID NO: 19 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 1 (Hu9D5VLv1).

SEQ ID NO: 20 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2 (Hu9D5VLv2).

SEQ ID NO: 21 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu9D5VLv3).

SEQ ID NO: 22 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4 (Hu9D5VLv4).

SEQ ID NO: 23 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 5 (Hu9D5VLv5).

SEQ ID NO: 24 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-L1 của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 25 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-L2 của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 26 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-L3 của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 27 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 9D5 được làm tương thích với người kiểu 1.

SEQ ID NO: 28 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2.

SEQ ID NO: 29 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2b.

SEQ ID NO: 30 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3.

SEQ ID NO: 31 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3b.

SEQ ID NO: 32 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4.

SEQ ID NO: 33 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4b.

SEQ ID NO: 34 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 9D5 được làm tương thích với người kiểu 5.

SEQ ID NO: 35 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 9D5 được làm tương thích với người kiểu 1.

SEQ ID NO: 36 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2.

SEQ ID NO: 37 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3.

SEQ ID NO: 38 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4.

SEQ ID NO: 39 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 9D5 được làm tương thích với người kiểu 5.

SEQ ID NO: 40 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 41 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 42 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 43 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 44 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 1 (Hu9D5VHv1).

SEQ ID NO: 45 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2 (Hu9D5VHv2).

SEQ ID NO: 46 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2b (Hu9D5VHv2b).

SEQ ID NO: 47 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu9D5VHv3).

SEQ ID NO: 48 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3b (Hu9D5VHv3b).

SEQ ID NO: 49 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4 (Hu9D5VHv4).

SEQ ID NO: 50 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4b (Hu9D5VHv4b).

SEQ ID NO: 51 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 5 (Hu9D5VHv5).

SEQ ID NO: 52 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 1 (Hu9D5VLv1).

SEQ ID NO: 53 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 2 (Hu9D5VLv2).

SEQ ID NO: 54 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu9D5VLv3).

SEQ ID NO: 55 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 4 (Hu9D5VLv4).

SEQ ID NO: 56 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người kiểu 5 (Hu9D5VLv5).

SEQ ID NO: 57 thể hiện trình tự axit amin của peptit tín hiệu vùng biến đổi chuỗi nặng 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 58 thể hiện trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu vùng biến đổi chuỗi nặng 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 59 thể hiện trình tự axit amin của peptit tín hiệu vùng biến đổi chuỗi nhẹ 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 60 thể hiện trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu vùng biến đổi chuỗi nhẹ 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 61 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 62 thể hiện trình tự axit amin của khuôn cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nặng của chuột 1MQK_H.

SEQ ID NO: 63 thể hiện trình tự axit amin của thể nhận biến đổi chuỗi nặng ACC# AAD30410.1.

SEQ ID NO: 64 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 1 (Hu14G8VHv1).

SEQ ID NO: 65 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 2 (Hu14G8VHv2).

SEQ ID NO: 66 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu14G8VHv3).

SEQ ID NO: 67 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-H1 của kháng thể 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 68 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-H2 của kháng thể 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 69 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-H3 của kháng thể 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 70 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 71 thể hiện trình tự axit amin của khuôn cấu trúc vùng biến đổi chuỗi nhẹ của chuột 1MJU_L.

SEQ ID NO: 72 thể hiện trình tự axit amin của thể nhận biến đổi chuỗi nhẹ ACC# ABA71374.1.

SEQ ID NO: 73 thể hiện trình tự axit amin của thể nhận biến đổi chuỗi nhẹ ACC# ABC66952.1.

SEQ ID NO: 74 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 1 (Hu14G8VLv1).

SEQ ID NO: 75 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 2 (Hu14G8VLv2).

SEQ ID NO: 76 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu14G8VLv3).

SEQ ID NO: 77 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-L1 của kháng thể 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 78 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-L2 của kháng thể 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 79 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-L3 của kháng thể 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 80 thể hiện trình tự axit amin của Kabat CDR-L1 của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu14G8VLv3).

SEQ ID NO: 81 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 14G8 được làm tương thích với người kiểu 1.

SEQ ID NO: 82 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 14G8 được làm tương thích với người kiểu 2.

SEQ ID NO: 83 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nặng 14G8 được làm tương thích với người kiểu 3.

SEQ ID NO: 84 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 14G8 được làm tương thích với người kiểu 1.

SEQ ID NO: 85 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 14G8 được làm tương thích với người kiểu 2.

SEQ ID NO: 86 thể hiện trình tự axit amin của chuỗi nhẹ 14G8 được làm tương thích với người kiểu 3.

SEQ ID NO: 87 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 88 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 89 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 90 thể hiện trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 của chuột với peptit tín hiệu.

SEQ ID NO: 91 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 1 (Hu14G8VHv1).

SEQ ID NO: 92 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 2 (Hu14G8VHv2).

SEQ ID NO: 93 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu14G8VHv3).

SEQ ID NO: 94 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 1 (Hu14G8VLv1).

SEQ ID NO: 95 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 2 (Hu14G8VLv2).

SEQ ID NO: 96 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể 14G8 được làm tương thích với người kiểu 3 (Hu14G8VLv3).

SEQ ID NO: 97 thể hiện trình tự axit amin của peptit tín hiệu vùng biến đổi chuỗi nặng 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 98 thể hiện trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu vùng biến đổi chuỗi nặng 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 99 thể hiện trình tự axit amin của peptit tín hiệu vùng biến đổi chuỗi nhẹ 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 100 thể hiện trình tự axit nucleic của peptit tín hiệu vùng biến đổi chuỗi nhẹ 14G8 của chuột.

SEQ ID NO: 101 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người được lấy làm ví dụ.

SEQ ID NO: 102 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người được lấy làm ví dụ của alotyp IgG1 G1m3.

SEQ ID NO: 103 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người được lấy làm ví dụ của alotyp IgG1 G1m3.

SEQ ID NO: 104 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ kapa của người được lấy làm ví dụ có arginin đầu cùng N.

SEQ ID NO: 105 thể hiện trình tự axit amin của vùng hằng định chuỗi nhẹ kapa của người được lấy làm ví dụ không có arginin đầu cùng N.

SEQ ID NO: 106 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng hằng định chuỗi nặng được lấy làm ví dụ của alotyp G1m3.

SEQ ID NO: 107 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ có arginin đầu cùng N.

SEQ ID NO: 108 thể hiện trình tự axit nucleic của vùng hằng định chuỗi nhẹ được lấy làm ví dụ không có arginin đầu cùng N.

SEQ ID NO: 109 thể hiện trình tự axit amin của transthyretin người được thể hiện ở số truy cập P02766.1 (UniProt).

SEQ ID NO: 110 thể hiện trình tự axit amin của transthyretin người được thể hiện ở số truy cập AAB35639.1 (Ngân hàng gen).

SEQ ID NO: 111 thể hiện trình tự axit amin của transthyretin người được thể hiện ở số truy cập AAB35640.1 (Ngân hàng gen).

SEQ ID NO: 112 thể hiện trình tự axit amin của transthyretin người được thể hiện ở số truy cập và ABI63351.1 (Ngân hàng gen).

SEQ ID NO: 113 thể hiện trình tự axit amin chứa các gốc 89-97 của transthyretin người.

SEQ ID NO: 114 thể hiện trình tự axit amin của chất sinh miễn dịch transthyretin tiềm năng.

SEQ ID NO: 115 thể hiện trình tự axit amin của chất sinh miễn dịch transthyretin tiềm năng.

SEQ ID NO: 116 thể hiện trình tự axit amin của chất sinh miễn dịch transthyretin tiềm năng.

SEQ ID NO: 117 thể hiện trình tự axit amin của phức hợp Chothia-Kabat CDR-H1 của kháng thể 9D5 của chuột.

SEQ ID NO: 118 thể hiện trình tự axit amin của phức hợp Chothia-Kabat CDR-H1 của kháng thể 14G8 của chuột.

Định nghĩa

Các kháng thể đơn dòng hoặc các thực thể sinh học khác thường được cung cấp ở dạng đã phân lập. Điều này có nghĩa là kháng thể hoặc thực thể sinh học khác thường tinh khiết ít nhất là 50% trọng lượng/trọng 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% trọng lượng/ trọng 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 loại đại phân tử chiếm ưu thế còn lại sau khi tinh chế nó.

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

trong khi đó liên kết không đặc hiệu thường là kết quả của lực van der Waals. Tuy nhiên liên kết đặc hiệu không nhất thiết có nghĩa là kháng thể liên kết với một và chỉ một đích.

Đơn vị cấu trúc kháng thể cơ bản là tetrame của các tiểu đơn vị. Mỗi tetrame bao gồm hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25 kDa) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70 kDa). Phần đầu cùng amino của mỗi chuỗi bao gồm vùng biến đổi chứa khoảng từ 100 đến 110 axit amin hoặc nhiều hơn chịu trách nhiệm chủ yếu 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 là vùng hằng định chịu trách nhiệm chủ yếu về chức năng phản ứng.

Các chuỗi nhẹ được phân loại là kapa hoặc lambđa. Các chuỗi nặng được phân loại là gama, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, và xác định isotyp của kháng thể lần lượt 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 axit amin hoặc nhiều hơn, với chuỗi nặng còn bao gồm vùng "D" chứa khoảng 10 axit amin hoặc nhiều hơn. Xem, tổng quan, Fundamental Immunology, Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989, Ch. 7 (được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ cho tất cả các mục đích).

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

Việc gán các axit amin vào mỗi vùng VL và VH tuân theo định nghĩa thông thường bất kỳ về các CDR. Các định nghĩa thông thường bao gồm, định nghĩa Kabat (Kabat, Sequences of Proteins of Immunological Interest (National Institutes of Health, Bethesda,

MD, 1987 và 1991), định nghĩa Chothia (Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917, 1987; Chothia và đồng tác giả, Nature 342:878-883, 1989); thể liên hợp CDR Chothia Kabat trong đó CDR-H1 là thể liên 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 tiếp xúc của Martin và đồng tác giả (bioinfo.org.uk/abs) (xem bảng 1). Kabat cung cấp quy ước đánh số được sử dụng rộng rãi (cách đánh số Kabat) trong đó các gốc tương ứng giữa các chuỗi nặng khác nhau hoặc giữa các chuỗi nhẹ khác nhau được đánh cùng một số. Khi kháng thể được cho là chứa các CDR theo một định nghĩa về CDR (ví dụ, Kabat), thì định nghĩa này xác định số lượng các gốc CDR tối thiểu có mặt trong kháng thể này (nghĩa là, các CDR Kabat). Không loại trừ là các gốc khác thuộc định nghĩa CDR thông thường khác nhưng nằm ngoài định nghĩa đã chỉ ra này cũng có mặt. Ví dụ, kháng thể chứa các CDR được xác định bởi Kabat bao gồm, trong số các khả năng có thể khác, kháng thể trong đó các CDR này chứa các gốc CDR Kabat và không chứa các gốc CDR khác, và kháng thể trong đó CDR H1 là CDR H1 liên hợp Chothia-Kabat và các CDR khác chứa các gốc CDR Kabat và không chứa thêm các gốc CDR theo các định nghĩa khác.

Bảng 1

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

Vòng	Kabat	Chothia	Thể liên hợp Chothia & Kabat	AbM	Tiếp xúc
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 chèn thêm gốc 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 đã sinh ra chúng để liên kết đặc hiệu với đích bao gồm các chuỗi nặng đơn lẻ, các chuỗi nhẹ Fab, Fab', $F(ab')_2$, F(ab)c, Dabs, các vi kháng thể, và Fv. Các đoạn có thể được tạo ra bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp, hoặc bằng cách tách bằng enzym hoặc hóa học các globulin miễn dịch nguyên vẹn. Thuật ngữ "kháng thể" cũng bao gồm kháng thể đặc hiệu kép và/hoặc kháng thể được làm tương thích với người. Kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể hai chức năng là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau và hai vị trí liên kết khác nhau (xem, ví dụ, Songsivilai và Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny và đồng tác giả, J. Immunol., 148:1547-53 (1992)). Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau này bao gồm cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ 9D5 được làm tương thích với người và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ đặc hiệu với một epitop trên transthyretin khác với epitop được liên kết bởi 9D5. Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau này bao gồm cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ 14G8 được làm tương thích với người và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ đặc hiệu với epitop trên transthyretin khác với epitop được liên kết bởi 14G8.

Trong một số kháng thể đặc hiệu kép, một cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ là kháng thể 9D5 hoặc 14G8 được làm tương thích với người như được mô tả thêm dưới đây và cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ còn lại là từ kháng thể liên kết với thụ thể được biểu hiện trên hàng rào máu não, chẳng hạn như thụ thể insulin, thụ thể yếu tố sinh trưởng tương tự insulin (insulin-like growth factor: IGF), thụ thể leptin, hoặc thụ thể lipoprotein, hoặc thụ thể transferrin (Friden và đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 88:4771-4775, 1991; Friden và đồng tác giả, Science 259:373-377, 1993). Kháng thể đặc hiệu kép này có thể được vận chuyển qua hàng rào máu não bằng cơ chế vận chuyển xuyên tế bào qua trung gian thụ thể.

Sự hấp thu ở não của kháng thể đặc hiệu kép này có thể được tăng cường thêm bằng cách thao tác di truyền kháng thể đặc hiệu kép này để làm giảm ái lực của nó với thụ thể hàng rào máu não. Ái lực với thụ thể giảm dẫn đến sự phân bố rộng hơn trong não (xem, ví dụ, Atwal và đồng tác giả, Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu và đồng tác giả, Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011).

Các kháng thể đặc hiệu kép điển hình cũng có thể là: (1) kháng thể vùng-biến đổi-kép (DVD-Ig), trong đó mỗi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng chứa hai vùng biến đổi nối tiếp nhau qua liên kết peptit ngắn (Wu và đồng tác giả, Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010)); (2) Tandab, mà là thể dung hợp của hai kháng thể 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 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 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 cuộn 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 cuộn 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). Epitop này có thể là tuyến tính, chẳng hạn như epitop chứa, ví dụ, 2-5, 3-5, 3-9, hoặc 5-9 axit amin liền kề từ SEQ ID NO: 109. Epitop này cũng

có thể là epitop cấu hình bao gồm, ví dụ, hai hoặc nhiều đoạn axit amin không liền kề nằm trong các gốc 89-97 của SEQ ID NO: 109.

Nếu một kháng thể được cho là liên kết với epitop bên trong các axit amin 89-97 của transthyretin (TTR), ví dụ, điều đó có nghĩa là epitop này nằm trong khoảng các axit amin đã đề cập bao gồm cả các axit amin xác định giới hạn ngoài của khoảng này. Điều này không nhất thiết có nghĩa là mọi axit amin nằm trong khoảng này đều tạo thành một phần của epitop này. Do đó, ví dụ, epitop nằm trong các axit amin 89-97 của TTR có thể chứa các axit amin 89-97, 89-96, 90-96, 91-96, 92-96, 93-96, 94-96, 89-96, 89-95, 89-94, 89-93, 89-92 hoặc 89-93, trong số các đoạn tuyến tính khác của SEQ ID NO: 113, hoặc trong trường hợp của epitop cấu hình, các đoạn axit amin không liền kề của SEQ ID NO: 113.

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

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

Thuật ngữ "tự nhiên" đối với cấu trúc transthyretin (TTR) dùng để chỉ cấu trúc được gấp bình thường của TTR ở trạng thái hoạt động đúng của nó (nghĩa là, tetrame TTR). Vì TTR là tetrame ở dạng được gấp tự nhiên của nó, dạng không tự nhiên của TTR bao gồm, ví dụ, các tetrame TTR cuộn gấp sai, các monome TTR, các dạng kết tụ của TTR, và các dạng sợi của TTR. Các dạng không tự nhiên của TTR có thể bao gồm các phân tử chứa các trình tự axit amin của TTR kiểu dại hoặc các đột biến.

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

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 "người bệnh" 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 đáng kể về mặt thống kê so với các cá thể không có yếu tố nguy cơ này.

Thuật ngữ "mẫu sinh học" dùng để chỉ mẫu chứa vật liệu sinh học nằm trong hoặc có thể thu được từ nguồn sinh học, ví dụ, người hoặc đối tượng là động vật có vú. Các mẫu này có thể là cơ quan, cơ quan tế bào, mô, các phần của mô, dịch cơ thể, máu ngoại vi, huyết tương máu, huyết thanh máu, tế bào, các phân tử, chẳng hạn như protein và peptit, và phần bất kỳ hoặc hỗn hợp bất kỳ thu được từ đó. Thuật ngữ mẫu sinh học cũng có thể bao gồm vật liệu bất kỳ thu được bằng cách xử lý mẫu này. Vật liệu thu được có thể bao gồm tế bào hoặc thế hệ con của chúng. Việc xử lý mẫu sinh học này có thể bao gồm một

hoặc nhiều quy trình lọc, chưng cất, chiết, cô đặc, cố định, bất hoạt các thành phần nhiễu, và tương tự.

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

Mô tả chi tiết sáng chế

Tổng quan

Sáng chế đề xuất các kháng thể liên kết đặc hiệu với các gốc 89-97 của transthyretin (TTR). Các kháng thể này có khả năng liên kết với các dạng monome, cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR. Các kháng thể này có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng bệnh hoặc rối loạn liên quan đến sự tích tụ TTR hoặc tích tụ các lắng đọng TTR (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR). Các kháng thể này cũng có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR, trong số các ứng dụng khác.

Các phân tử đích

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

Chức năng đã được xác định của TTR trong máu là vận chuyển protein liên kết *holo*-retinol. Mặc dù TTR là chất vận chuyển chính của thyroxin (T_4) trong máu của động vật gặm nhấm, bằng cách sử dụng các vị trí liên kết vuông góc với các vị trí được sử dụng cho protein liên kết *holo*-retinol, các vị trí liên kết T_4 không bị chiếm hữu hiệu ở người.

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

Trừ khi được quy định theo cách khác, việc đề cập đến transthyretin (TTR) hoặc các đoạn hoặc vùng của nó bao gồm các trình tự axit amin tự nhiên của người bao gồm các dạng đồng phân, đột biến và các biến thể alen của chúng. Các trình tự polypeptit TTR điển hình được ký hiệu bằng các số truy cập P02766.1 (UniProt), AAB35639.1 (Ngân hàng gen), AAB35640.1 (Ngân hàng gen), và ABI63351.1 (Ngân hàng gen) (SEQ ID NO: 109-112, tương ứng). Các gốc được đánh số theo Swiss Prot P02766.1, với axit amin đầu tiên của protein trưởng thành (nghĩa là, không bao gồm trình tự tín hiệu 20 axit amin) được ký hiệu là gốc 1. Trong protein TTR khác bất kỳ, các gốc được đánh số theo các gốc tương ứng trong P02766.1 trên sự canh thẳng tối đa.

Bệnh thoái hóa dạng tinh bột transthyretin

Bệnh thoái hóa dạng tinh bột transthyretin (TTR) là rối loạn toàn thân được đặc trưng bởi TTR cuộn gấp sai, gây bệnh và sự lắng đọng ngoại bào của các sợi dạng tinh bột được tạo thành từ TTR. Bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR thường gây ra bởi sự mất ổn

định của dạng tetrame TTR tự nhiên (do các điều kiện môi trường hoặc di truyền), dẫn đến sự phân ly, cuộn gấp sai, và sự tích tụ TTR thành các sợi dạng tinh bột tích lũy trong nhiều cơ quan và mô khác nhau gây ra rối loạn nặng dần. Xem, ví dụ, Almeida và Saraiva, FEBS Letters 586:2891-2896 (2012); Ando và đồng tác giả, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013).

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

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

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

TTR xuất phát từ sự phá hủy chọn lọc mô tim của chúng, trong khi đó bệnh lý do các biến thể TTR khác đến từ việc gây tổn thương hệ thần kinh ngoại biên và thực vật. Sự tổn thương mô do tạo dạng tinh bột TTR dường như chủ yếu bắt nguồn từ sự gây độc tế bào của các khối kết tụ TTR nhỏ, có thể khuếch tán, mặc dù sự tích lũy dạng tinh bột ngoại bào có thể góp phần và gần như chắc chắn gây tổn thương cấu trúc cơ quan trong các giai đoạn muộn của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR.

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

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

Việc chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR thường dựa trên các mẫu sinh thiết cơ quan đích, sau đó bằng cách nhuộm mô đã cắt ra bằng thuốc nhuộm đặc hiệu với tinh bột, đỏ Congo. Nếu thử nghiệm dương tính với dạng tinh bột được quan sát thấy, bước nhuộm hóa học mô miễn dịch đối với TTR được thực hiện tiếp để đảm bảo là protein tiền chất chịu trách nhiệm về việc tạo tinh bột thực sự là TTR. Đối với các dạng có tính gia đình

của bệnh này, việc chứng minh đột biến trong gen mã hóa TTR sau đó là cần thiết trước khi thực hiện chẩn đoán. Việc này có thể được thực hiện, ví dụ, bằng kỹ thuật điện di tập trung điểm đẳng điện, phản ứng chuỗi polymeraza, hoặc cắt laze/sắc ký lỏng ghép hai lần khối phổ. Xem, ví dụ, US 2014/0056904; Ruberg và Berk, Circulation 126:1286-1300 (2012); Ando và đồng tác giả, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013).

Kháng thể

Tính đặc hiệu liên kết và các đặc điểm chức năng

Sáng chế đề xuất các kháng thể đơn dòng liên kết với protein transthyretin (TTR), cụ thể hơn, với các epitop nằm trong các gốc axit amin 89-97 (SEQ ID NO: 113) của TTR. Các epitop này bị vùi trong tetrame TTR tự nhiên và được bộc lộ ở các dạng monome, cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR.

Các kháng thể được ký hiệu là 9D5 và 14G8 là hai kháng thể chuột điển hình. Trừ khi có quy định khác, việc đề cập đến 9D5 hoặc 14G8 nên được hiểu là đề cập đến dạng bất kỳ trong số các dạng kháng thể chuột, khảm, được ngụy trang và dạng được làm tương thích với người của các kháng thể này. Các kháng thể này liên kết đặc hiệu bên trong các gốc axit amin 89-97 (SEQ ID NO: 113) của TTR. Các kháng thể này được đặc trưng thêm bởi khả năng liên kết với dạng monome, cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR nhưng không liên kết với các dạng tetrame tự nhiên của TTR. Thêm vào đó, các kháng thể này được đặc trưng bởi khả năng phản ứng miễn dịch của chúng trên mô tim bị thoái hóa dạng tinh bột do TTR nhưng không phản ứng miễn dịch trên mô tim khỏe mạnh. Khả năng liên kết với các protein đặc hiệu hoặc các đoạn của nó có thể được chứng minh bằng cách sử dụng các kiểu thử nghiệm điển hình được cung cấp trong phần ví dụ thực hiện sáng chế.

Một số kháng thể liên kết với cùng một epitop hoặc epitop chồng lặp với kháng thể được ký hiệu là 9D5 hoặc 14G8. Các trình tự của vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể này được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 1 và 16 (9D5), và 61 và 70 (14G8). Các kháng thể khác có tính đặc hiệu liên kết này có thể được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột bằng TTR, hoặc một phần của nó chứa epitop mong muốn (ví dụ, SEQ ID NO: 113), và sàng lọc các kháng thể thu được về khả năng liên kết với TTR monome hoặc peptit chứa SEQ ID NO: 113, tùy ý cạnh tranh với kháng thể có vùng biến đổi của 9D5 hoặc 14G8 (IgG1 kapa) của chuột. Các đoạn của TTR chứa epitop mong muốn có thể được liên kết với chất mang giúp gây ra đáp ứng kháng thể với đoạn này và/hoặc

được kết hợp với tá dược giúp gây ra đáp ứng này. Các kháng thể này có thể được sàng lọc về khả năng liên kết phân biệt với các dạng monome, kiểu dại của TTR hoặc một đoạn của nó (ví dụ, SEQ ID NO: 113) so với các đột biến của các gốc xác định. Việc sàng lọc dựa trên các đột biến này xác định chính xác hơn tính đặc hiệu liên kết để cho phép nhận diện các kháng thể có khả năng liên kết bị ức chế bởi sự gây đột biến các gốc cụ thể và các kháng thể có thể có chung các đặc điểm chức năng với các kháng thể điển hình khác. Các đột biến này có thể là sự 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, 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, 9D5 hoặc 14G8) 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 vùng biến đổi chuỗi nặng của người được sắp xếp lại. Thể thực khuẩn thể hiện khả năng liên kết đặc hiệu mạnh (ví dụ, ít nhất là 10^8 và tốt hơn, nếu ít nhất là 10^9 M^{-1}) đối với TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 89-97) được lựa chọn. Sau đó vùng biến đổi chuỗi nặng từ thể thực khuẩn này đóng vai trò là nguyên liệu khởi đầu để xây dựng thư viện thể thực khuẩn khác nữa. Trong thư viện này, mỗi thể thực khuẩn biểu hiện cùng một vùng biến đổi chuỗi nặng (nghĩa là, vùng được xác định từ thư viện biểu hiện thứ nhất) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ khác. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ này có thể thu được, ví dụ, từ thư viện vùng chuỗi nhẹ biến đổi của người được sắp xếp lại. Một lần nữa, thể thực khuẩn thể hiện khả năng liên kết đặc hiệu mạnh với TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 89-97) được lựa chọn. Các kháng thể tạo thành thường có cùng tính đặc hiệu epitop hoặc tính đặc hiệu epitop tương tự với nguyên liệu khởi đầu của chuột. Các CDR Kabat của chuỗi nặng của 9D5 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 13-15 và các CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 9D5 được ký hiệu

lần lượt là SEQ ID NO: 24-26. Thể liên hợp Chothia-Kabat CDR-H1 của 9D5 được ký hiệu là SEQ ID NO: 117. Các CDR Kabat của chuỗi nặng của 14G8 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 67-69 và các CDR Kabat của chuỗi nhẹ của 14G8 được ký hiệu lần lượt là SEQ ID NO: 77-79. Thể liên hợp Chothia-Kabat CDR-H1 của 14G8 được ký hiệu là SEQ ID NO: 118. Biến thể của CDR-L1 của 14G8 được ký hiệu là SEQ ID NO: 80.

Các kháng thể khác có thể thu được bằng kỹ thuật gây đột biến cADN mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể điển hình, chẳng hạn như 9D5 hoặc 14G8. Các kháng thể đơn dòng mà tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 9D5 hoặc 14G8 về trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc nhẹ trưởng thành và duy trì được các đặc điểm chức năng của nó, và/hoặc khác biệt với kháng thể tương ứng ở một số lượng nhỏ các đột biến thế (ví dụ, đột biến thế bảo thủ), đột biến mất đoạn, hoặc đột biến chèn đoạn axit amin không quan trọng về chức năng cũng được bao gồm trong sáng chế. Các kháng thể đơn dòng có ít nhất một hoặc toàn bộ sáu CDR như được xác định bằng định nghĩa thông thường bất kỳ, nhưng tốt hơn nếu là Kabat, mà tương đồng 90%, 95%, 99% hoặc 100% với các CDR tương ứng của 9D5 hoặc 14G8 cũng được bao gồm.

Sáng chế cũng đề xuất các kháng thể có một số hoặc toàn bộ (ví dụ, 3, 4, 5, và 6) CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ 9D5 hoặc 14G8. 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 9D5 hoặc 14G8 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 9D5 hoặc 14G8. Các kháng thể này có thể bao gồm cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. CDR chủ yếu là từ CDR 9D5 hoặc 14G8 tương ứng khi nó chứa không nhiều hơn 4, 3, 2, hoặc 1 đột biến thế, đột biến chèn đoạn 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 chèn đoạn hoặc đột biến mất đoạn. Các kháng thể này có thể có sự tương đồng ít nhất là 70%, 80%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với 9D5 hoặc 14G8 về trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng và/hoặc nhẹ trưởng thành và duy trì được các đặc điểm chức năng của chúng, và/hoặc khác biệt với 9D5 hoặc 14G8 ở một số lượng nhỏ các đột biến thay thế (ví dụ, đột biến thế bảo thủ), đột biến mất đoạn, hoặc đột biến chèn đoạn axit amin không quan trọng về chức năng.

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

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

Các kháng thể không phải của người

Sự tạo thành các kháng thể không phải của người khác, ví dụ, chuột, chuột lang, linh trưởng, thỏ hoặc chuột cống kháng lại TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 89-97) có thể được thực hiện bằng cách, ví dụ, gây miễn dịch động vật này với TTR hoặc một đoạn của nó. Xem Harlow & Lane, Antibodies, A Laboratory Manual (CSHP NY, 1988) (được đưa vào bằng cách viện dẫn cho tất cả các mục đích). Các kháng nguyên này có thể thu được từ nguồn tự nhiên, bằng cách tổng hợp peptit, hoặc biểu hiện tái tổ hợp. Tùy ý, kháng nguyên này có thể được sử dụng bằng cách được dung hợp hoặc tạo phức với protein mang. Tùy ý, kháng nguyên này có thể được sử dụng với tá 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 cho động vật thí nghiệm. Thỏ hoặc chuột lang thường được sử dụng để tạo ra các kháng thể đa dòng. Chuột thường được sử dụng để tạo ra các kháng thể đơn dòng. Các kháng thể được sàng lọc về khả năng liên kết đặc hiệu với TTR monome hoặc epitop trong TTR (ví dụ, epitop chứa

một hoặc nhiều trong số các gốc axit amin 89-97). Việc sàng lọc này có thể được thực hiện bằng cách xác định khả năng liên kết của kháng thể với tập hợp các biến thể TTR monome, chẳng hạn như các biến thể TTR chứa các gốc axit amin 89-97 hoặc các đột biến trong các gốc này, và xác định các biến thể TTR liên kết với kháng thể này. Khả năng liên kết có thể được đánh giá, ví dụ, bằng kỹ thuật thẩm tách Western, FACS hoặc ELISA.

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 phôi. Do đó, kháng thể được làm tương thích với người là kháng thể có ít nhất là ba, bốn, năm hoặc toàn bộ các CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ kháng thể cho và các trình tự khung vùng biến đổi và vùng hằng định, nếu có mặt, hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ các trình tự kháng thể người. Tương tự, chuỗi nặng được làm tương thích với người có ít nhất là một, hai và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ chuỗi nặng của kháng thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng hằng định chuỗi nặng, nếu có mặt, chủ yếu là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nặng của người và vùng hằng định của người. Tương tự, chuỗi nhẹ được làm tương thích với người có ít nhất là một, hai và thường là toàn bộ ba CDR hoàn toàn hoặc chủ yếu là từ chuỗi nhẹ kháng thể cho, và trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng hằng định chuỗi nhẹ, nếu có mặt, chủ yếu là từ các trình tự khung vùng biến đổi chuỗi nhẹ của người và vùng hằng định của người. Khác với các vi kháng thể và dAb, kháng thể được làm tương thích với người chứa chuỗi nặng được làm tương thích với người và chuỗi nhẹ được làm tương thích với người. CDR trong kháng thể được làm tương thích với người chủ yếu là từ CDR tương ứng trong kháng thể không phải của người khi ít nhất là 85%, 90%, 95% hoặc 100% các gốc tương ứng (như được xác định bởi định nghĩa thông thường bất kỳ nhưng tốt hơn nếu được xác định bằng Kabat) là giống nhau giữa các CDR tương ứng. Các trình tự khung vùng biến đổi của chuỗi kháng thể hoặc vùng hằng định của chuỗi kháng thể chủ yếu là từ trình tự khung vùng biến đổi của người hoặc vùng hằng định của người, tương ứng, khi ít nhất là 85%, 90%, 95%

hoặc 100% các gốc tương ứng được xác định bằng định nghĩa thông thường bất kỳ nhưng tốt hơn nếu được xác định bởi Kabat là giống nhau.

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

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

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

Ví dụ về các trình tự nhận cho chuỗi nặng là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 3 và 4) và vùng biến đổi chuỗi nặng thuộc phân nhóm Kabat người 3. BAC02114 có chung một dạng chính tắc với chuỗi nặng 9D5 của chuột. Các ví dụ khác về các trình tự nhận cho chuỗi nặng này là vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là AAD30410.1 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 và 4, tương ứng) và vùng biến đổi chuỗi nặng thuộc phân nhóm Kabat người 1. AAD30410.1 và AAX82494.1 bao gồm hai CDR có cùng dạng chính tắc với chuỗi nặng 14G8 của chuột. Ví dụ về các trình tự nhận cho chuỗi nhẹ là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là ABC66952 (SEQ ID NO: 18) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ thuộc phân nhóm Kabat người 3. ABC66952 bao gồm hai CDR có cùng dạng chính tắc với chuỗi nhẹ 9D5 của chuột. Các ví dụ khác về trình tự nhận cho chuỗi nhẹ là vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là ABA71374.1 và ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 và 73, tương ứng) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ thuộc phân nhóm Kabat người 2. ABA71374.1 và ABC66952.1 có cùng dạng chính tắc với chuỗi nhẹ 14G8 của chuột.

Nếu nhiều hơn một trình tự kháng thể nhận của người được lựa chọn, thể liên hợp hoặc 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, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 3 và 4) được sử dụng làm các trình tự nhận để làm tương thích với người vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành 9D5. Ví dụ về các vị trí, trong đó hai trình tự nhận này khác nhau, bao gồm các vị trí H19 (R hoặc K), H40 (A hoặc T), H44 (G hoặc R), H49 (S hoặc A), H77 (S hoặc T), H82a (N hoặc S), H83 (R hoặc K), H84 (A hoặc S), và H89 (V hoặc M). Các dạng được làm tương thích với người của vùng biến đổi chuỗi nặng 9D5 có thể bao gồm mỗi axit amin ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí này. Tương tự, vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là AAD30410.1 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 và 4, tương ứng) được sử dụng làm các trình tự nhận để làm tương thích với người vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành 14G8. Ví dụ về các vị trí, trong đó hai trình tự nhận này khác nhau, bao gồm các vị trí H82a (N hoặc S), H83 (R hoặc K), H84 (A hoặc S), và H89 (V hoặc M). Các dạng được làm tương thích với người của vùng biến đổi chuỗi nặng 14G8 có thể bao gồm mỗi axit amin ở bất kỳ

trong số các vị trí này. Tương tự, vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người với mã truy cập NCBI là ABA71374.1 và ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 và 73, tương ứng) được sử dụng làm các trình tự nhận để làm tương thích với người vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành 14G8. Ví dụ về vị trí, trong đó hai trình tự nhận này khác nhau, là vị trí L18 (S hoặc P). Các dạng được làm tương thích với người của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 14G8 có thể bao gồm mỗi axit amin ở vị trí này.

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

Ví dụ, khi một axit amin khác nhau giữa gốc khung vùng biến đổi của chuột và gốc khung vùng biến đổi của người đã chọn, axit amin khung người này có thể được thay thế bằng axit amin khung tương đương từ kháng thể chuột khi 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) ngoài ra, tương tác với vùng CDR (ví dụ, trong khoảng 6 Å của vùng CDR), (ví dụ, được nhận diện bằng cách tạo mô hình chuỗi nhẹ hoặc nặng trên cấu trúc đã được giải thích của chuỗi globulin miễn dịch tương đồng đã biết); hoặc

(4) là gốc tham gia vào mặt phân cách VL-VH.

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

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

Các kháng thể được làm tương thích với người điển hình là các dạng được làm tương thích với người của kháng thể 9D5 hoặc 14G8 của chuột, được ký hiệu lần lượt là Hu9D5 hoặc Hu14G8. Kháng thể 9D5 của chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa lần lượt SEQ ID NO: 1 và SEQ ID NO: 16. Sáng chế đề xuất tám vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: Hu9D5VHv1, Hu9D5VHv2, Hu9D5VHv2b, Hu9D5VHv3, Hu9D5VHv3b, Hu9D5VHv4, Hu9D5VHv4b, và Hu9D5VHv5 (SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12, tương ứng). Sáng chế còn đề xuất năm vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ: Hu9D5VLv1, Hu9D5VLv2, Hu9D5VLv3, Hu9D5VLv4, và Hu9D5VLv5 (SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23, tương ứng). Fig.1 thể hiện sự canh thẳng trình tự 9D5, kháng thể mẫu của chuột, kháng thể nhận của người, và nhiều kháng thể được làm tương thích với người khác nhau.

Kháng thể 14G8 của chuột chứa vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin chứa lần lượt SEQ ID NO: 61 và SEQ ID NO: 70. Sáng chế đề xuất ba vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ: Hu14G8VHv1, Hu14G8VHv2, và Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66, tương ứng). Sáng chế còn đề xuất ba vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành của người được lấy làm ví dụ: Hu14G8VLv1, Hu14G8VLv2, và Hu14G8VLv3 (SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76, tương ứng). Fig.2 thể hiện sự canh thẳng trình tự của 14G8, kháng thể mẫu của chuột, kháng thể nhận của người, 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 khác 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, 15 vị trí khung vùng biến đổi sau đây

được xem là ứng viên cho các đột biến thay thế trong tám vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành Hu9D5 được lấy làm ví dụ và năm vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành Hu9D5 được lấy làm ví dụ, như được xác định thêm trong các ví dụ: H42 (G42E), H47 (W47L), H69 (I69F), H82 (M82S), H82b (S82(b)L), H108 (T108L), L8 (P8A), L9 (L9P), L18 (P18S), L19 (A19V), L36 (Y36F), L39 (K39R), L60 (D60S), L70 (D70A), và L74 (K74R). Tương tự, 11 vị trí khung vùng biến đổi sau đây được xem là ứng viên cho các đột biến thay thế trong ba vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành Hu14G8 được lấy làm ví dụ và ba vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành Hu14G8 được lấy làm ví dụ, như được xác định thêm trong các ví dụ: H1 (Q1E), H3 (Q3K), H47 (W47L), H105 (Q105T), L8 (P8A), L9 (L9P), L19 (A19V), L26 (N26S), L36 (Y36F), L60 (D60S), và L70 (D70A).

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 thể liên hợp CDR Chothia-Kabat trong trường hợp CDR-H1 vào khung nhận của người (ví dụ, khung nhận của người liên hợp hoặc lai), và gốc được đề cập thứ hai là gốc đang được cân nhắc 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 Hu9D5 được lấy làm ví dụ bao gồm các hoán vị hoặc các tổ hợp bất kỳ của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành được lấy làm ví dụ (ví dụ, VHv1/VLv1 hoặc H1L1, VHv1/VLv2 hoặc H1L2, VHv1/VLv3 hoặc H1L3, VHv1/VLv4 hoặc H1L4, VHv1/VLv5 hoặc H1L5, VHv2/VLv1 hoặc H2L1, VHv2/VLv2 hoặc H2L2, VHv2/VLv3 hoặc H2L3, VHv2/VLv4 hoặc H2L4, VHv2/VLv5 hoặc H2L5, VHv2b/VLv1 hoặc H2bL1, VHv2b/VLv2 hoặc H2bL2, VHv2b/VLv3 hoặc H2bL3, VHv2b/VLv4 hoặc H2bL4, VHv2b/VLv5 hoặc H2bL5, VHv3/VLv1 hoặc H3L1, VHv3/VLv2 hoặc H3L2, VHv3/VLv3 hoặc H3L3, VHv3/VLv4 hoặc H3L4, VHv3/VLv5 hoặc H3L5, VHv3b/VLv1 hoặc H3bL1, VHv3b/VLv2 hoặc H3bL2, VHv3b/VLv3 hoặc H3bL3, VHv3b/VLv4 hoặc H3bL4, VHv3b/VLv5 hoặc H3bL5, VHv4/VLv1 hoặc H4L1, VHv4/VLv2 hoặc H4L2, VHv4/VLv3 hoặc H4L3, VHv4/VLv4 hoặc H4L4, VHv4/VLv5 hoặc H4L5, VHv4b/VLv1 hoặc H4bL1, VHv4b/VLv2 hoặc H4bL2, VHv4b/VLv3 hoặc H4bL3, VHv4b/VLv4 hoặc H4bL4, VHv4b/VLv5 hoặc H4bL5, VHv5/VLv1 hoặc H5L1, VHv5/VLv2 hoặc H5L2, VHv5/VLv3 hoặc H5L3, VHv5/VLv4 hoặc H5L4, và VHv5/VLv5 hoặc H5L5).

Sáng chế đề xuất các biến thể của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người này thể hiện sự tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với Hu9D5VHv4b được làm tương thích với người (SEQ ID NO: 11) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người này thể hiện sự tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với Hu9D5VLv1 (SEQ ID NO: 19). Trong một số kháng thể này, ít nhất là 1, 2, hoặc toàn bộ 3 đột biến ngược hoặc các đột biến khác trong Hu9D5 H4bL1 được giữ lại. Sáng chế cũng đề xuất các biến thể của các kháng thể 9D5 được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ còn lại. Các biến thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành thể hiện sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành của các kháng thể 9D5 H1L1, H1L2, H1L3, H1L4, H1L5, H2L1, H2L2, H2L3, H2L4, H2L5, H2bL1, H2bL2, H2bL3, H2bL4, H2bL5, H3L1, H3L2, H3L3, H3L4, H3L5, H3bL1, Hb3L2, H3bL3, Hb3L4, H3bL5, H4L1, H4L2, H4L3, H4L4, H4L5, H4bL1, H4bL2, H4bL3, H4bL4, H4bL5, H5L1, H5L2, H5L3, H5L4, hoặc H5L5 được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ.

Trong một số kháng thể, ít nhất là một trong các vị trí H42, H47, H69, H82, H82b, và H108 trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi E, L, F, S, L, và L. Trong một số kháng thể, các vị trí H47, H69, và H82 trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi L, F, và S, như trong Hu9D5VHv1. Trong một số kháng thể, các vị trí H47, H69, H82, và H82b trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi L, F, S, và L, như trong Hu9D5VHv2. Trong một số kháng thể, các vị trí H42, H47, và H108 trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi E, L, và L, như trong Hu9D5VHv2b. Trong một số kháng thể, các vị trí H69, H82, và H82b trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi F, S, và L, như trong Hu9D5VHv3. Trong một số kháng thể, mỗi vị trí H47 và H108 trong vùng Vh bị chiếm bởi L, như trong Hu9D5VHv3b và Hu9D5Vhv4b. Trong một số kháng thể, các vị trí H82 và H82b trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi S và L, như trong Hu9D5VHv4. Trong một số kháng thể, các vị trí H42, H47, và H82b trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi E, L, và L, như trong Hu9D5VHv5. Trong một số kháng thể, ít nhất là một trong các vị trí L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70, và L74 trong vùng Vk lần lượt bị chiếm bởi A, P, S, V, F, R, S, A, và R. Trong một số kháng thể, vị trí L36 trong vùng Vk bị chiếm bởi F, như trong Hu9D5VLv1. Trong một số kháng thể, vị trí L60 trong vùng Vk bị chiếm bởi S, như trong Hu9D5VLv3. Trong một số kháng thể, các vị trí

L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70, và L74 trong vùng Vk lần lượt bị chiếm bởi A, P, V, F, R, S, A, và R, như trong Hu9D5VLv4. Trong một số kháng thể, các vị trí L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70, và L74 trong vùng Vk lần lượt bị chiếm bởi A, P, S, V, F, R, S, A, và R, như trong Hu9D5VLv5. Các vùng CDR của các kháng thể được làm tương thích với người này có thể là giống hoặc gần như giống với các vùng CDR của kháng thể cho 9D5 của chuột hoặc bất kỳ trong số các kháng thể 9D5 được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ trên đây. Các vùng CDR có thể được xác định theo định nghĩa thông thường bất kỳ (ví dụ, Chothia, hoặc kết hợp Chothia và Kabat) nhưng tốt hơn, nếu được xác định theo 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 Hu9D5 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 thay thế, đột biến mất đoạn hoặc đột biến chèn đoạn. Các khác biệt này thường nằm trong khung nhưng cũng có thể xảy ra trong các CDR.

Các kháng thể Hu14G8 được lấy làm ví dụ bao gồm các hoán vị hoặc tổ hợp bất kỳ của các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành được lấy làm ví dụ (ví dụ, VHv1/VLv1 hoặc H1L1, VHv1/VLv2 hoặc H1L2, VHv1/VLv3 hoặc H1L3, VHv2/VLv1 hoặc H2L1, VHv2/VLv2 hoặc H2L2, VHv2/VLv3 hoặc H2L3, VHv3/VLv1 hoặc H3L1, VHv3/VLv2 hoặc H3L2, và VHv3/VLv3 hoặc H3L3).

Sáng chế đề xuất các biến thể của các kháng thể 14G8 được làm tương thích với người, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện sự tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với Hu14G8VHv2 (Hu14G8 H2) (SEQ ID NO: 65) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người thể hiện sự tương đồng ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với Hu14G8VLv3 (Hu14G8 L3) (SEQ ID NO: 76). Trong một số kháng thể này, ít nhất là 1, 2, 3, 4, hoặc toàn bộ 5 đột biến ngược hoặc các đột biến khác trong Hu14G8 H2L3 được giữ lại. Sáng chế cũng đề xuất các biến thể của các kháng thể 14G8 được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ còn lại. Các biến thể này có vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành thể hiện sự tương đồng trình tự ít nhất là 90%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ trưởng thành của các kháng thể 14G8 H1L1,

H1L2, H1L3, H2L1, H2L2, H2L3, H3L1, H3L2, hoặc H3L3 được làm tương thích với người được lấy làm ví dụ.

Trong một số kháng thể, ít nhất là một trong các vị trí H1 và H47 trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi E và L. Trong một số kháng thể, các vị trí H1 và H47 trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi E và L, như trong Hu14G8VHv2 và Hu14G8VHv3. Trong một số kháng thể, ít nhất là một trong các vị trí H3 và H105 trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi K và T. Trong một số kháng thể, các vị trí H3 và H105 trong vùng Vh lần lượt bị chiếm bởi K và T, như trong Hu14G8VHv1. Trong một số kháng thể, vị trí L36 trong vùng Vk bị chiếm bởi F, như trong Hu14G8VLv2. Trong một số kháng thể, ít nhất là một trong các vị trí L8, L9, L19, L26, L60, và L70 trong vùng Vk lần lượt bị chiếm bởi A, P, V, S, S, và A. Trong một số kháng thể, các vị trí L8, L9, L19, và L70 trong vùng Vk lần lượt bị chiếm bởi A, P, V, và A, như trong Hu14G8VLv1. Trong một số kháng thể, mỗi vị trí L26 và L60 trong vùng Vk bị chiếm bởi S, như trong Hu14G8VLv3. Các vùng CDR của các kháng thể được làm tương thích với người này có thể là giống hoặc gần như giống với các vùng CDR của kháng thể cho 14G8 của chuột. Các vùng CDR này có thể được xác định theo định nghĩa thông thường bất kỳ (ví dụ, Chothia, hoặc kết hợp Chothia và Kabat) nhưng tốt hơn, nếu được xác định theo 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 chuỗi nặng và nhẹ Hu14G8 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 chèn đoạn. 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 9D5 hoặc 14G8 được làm tương thích với người là các đột biến ngược bổ sung trong khung vùng biến đổi. Nhiều gốc khung không tiếp xúc với các CDR trong mAb được làm tương thích với người có thể chứa các đột biến thế của các axit amin từ các vị trí tương ứng của mAb cho của chuột hoặc các kháng thể của chuột hoặc người khác, và ngay cả nhiều gốc tiếp xúc với CDR tiềm năng cũng bị thay thế. Ngay cả các axit amin nằm trong các CDR cũng có thể bị thay đổi, ví dụ, với các gốc được tìm thấy ở các vị trí tương ứng của trình tự nhận của người được sử dụng để cung cấp các khung vùng biến đổi. Thêm vào đó, các trình tự nhận xen kẽ của người có thể được sử dụng, ví dụ, cho chuỗi nặng và/hoặc nhẹ. Nếu các trình tự nhận khác nhau

được sử dụng, một hoặc nhiều đột biến ngược được đề nghị trên đây có thể không được thực hiện vì các gốc cho và nhận tương ứng đã giống nhau sẵn mà không cần các đột biến ngược.

Tốt hơn, nếu các đột biến thế hoặc đột biến ngược trong các biến thể 9D5 hoặc 14G8 được làm tương thích với người (bảo thủ hoặc không bảo thủ) không gây tác dụng đáng kể trên ái lực liên kết hoặc hiệu lực của mAb được làm tương thích với người, nghĩa là, khả năng liên kết với TTR monome của nó (ví dụ, hiệu lực trong một số hoặc tất cả các thử nghiệm được mô tả trong các ví dụ về kháng thể 9D5 hoặc 14G8 biến đổi được làm tương thích với người gần như là giống, nghĩa là, trong khoảng sai số thí nghiệm, với hiệu lực của kháng thể 9D5 hoặc 14G8 của chuột).

Kháng thể khảm và được ngụy trang

Sáng chế còn đề xuất các dạng khảm và được ngụy trang của các kháng thể không phải của người, cụ thể là các kháng thể 9D5 hoặc 14G8 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.

Kháng thể được ngụy trang là loại kháng thể được làm tương thích với người mà giữ được một số và thường là toàn bộ các CDR và một số gốc khung vùng biến đổi không phải của người của kháng thể không phải của người nhưng thay thế các gốc khung vùng biến đổi khác mà có thể góp phần vào các epitop tế bào B hoặc T, ví dụ, các gốc được bộc lộ (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991) với các gốc từ các vị trí tương ứng của trình tự kháng thể người. Kết quả là một kháng thể trong đó các CDR hoàn toàn hoặc gần như là từ kháng thể không phải của người và các khung vùng biến đổi của kháng thể không phải của người được làm cho giống người hơn nhờ các đột biến thế này. Các dạng được ngụy trang của kháng thể 9D5 hoặc 14G8 được bao gồm trong sáng chế.

Kháng thể người

Các kháng thể người kháng TTR monome hoặc một đoạn của nó (ví dụ, các gốc axit amin 89-97 (SEQ ID NO: 113) của TTR) được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau được

mô tả dưới đây. Một số kháng thể người được chọn lọc bằng các thí nghiệm liên kết cạnh tranh, bằng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn của Winter, trên đây, hoặc theo cách khác, để có cùng tính đặc hiệu epitop với kháng thể chuột cụ thể, chẳng hạn như một trong số các kháng thể đơn dòng của chuột được mô tả trong các ví dụ. Các kháng thể người cũng có thể được sàng lọc về tính đặc hiệu epitop cụ thể bằng cách chỉ sử dụng một đoạn TTR, chẳng hạn như biến thể TTR chỉ chứa các gốc axit amin 89-97 của TTR, làm kháng nguyên đích, và/hoặc bằng cách sàng lọc các kháng thể kháng lại tập hợp các biến thể TTR, chẳng hạn như các biến thể TTR chứa nhiều đột biến khác nhau trong các gốc axit amin 89-97 của TTR.

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

Lựa chọn vùng hằng định

Vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của các kháng thể khảm, được ngụy trang hoặc được làm tương thích với người có thể được liên kết với ít nhất là một phần của vùng hằng định của người. Việc lựa chọn vùng hằng định phụ thuộc, một phần, vào tác dụng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể, sự thực bào phụ thuộc kháng thể và/hoặc tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể có được mong muốn hay không. Ví dụ, các isotyp người IgG1 và IgG3 có tác dụng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể và các isotyp người IgG2 và IgG4 thì không. IgG1 và IgG3 người cũng cảm ứng các chức năng hiệu ứng qua trung gian tế bào mạnh hơn so với IgG2 và IgG4 người. Các vùng hằng định chuỗi nhẹ có thể là lambđa hoặc kapa.

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 ở các vùng hằng định để làm giảm hoặc làm tăng chức năng hiệu ứng chẳng hạn như tác dụng gây độc tế bào qua trung gian bổ thể hoặc ADCC (xem, ví dụ, Winter và đồng tác giả, patent Mỹ số 5,624,821; Tso và đồng tác giả, patent Mỹ số 5,834,597; và Lazar và đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006), hoặc để kéo dài thời gian bán thải ở người (xem, ví dụ, Hinton và đồng tác giả, J. Biol. Chem. 279:6213, 2004). Các đột biến thế điển hình bao gồm Gln ở vị trí 250 và/hoặc Leu ở vị trí 428 (cách đánh số EU được sử dụng trong đoạn này cho vùng hằng định) để làm tăng thời gian gian bán thải của kháng thể. Đột biến thế ở bất kỳ hoặc tất cả các vị trí 234, 235, 236 và/hoặc 237 làm giảm ái lực đối với các thụ thể Fcγ, đặc biệt 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 trong IgG2 người được thay thế bằng alanin và vị trí 235 bằng glutamin (xem, ví dụ, US 5,624,821). Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 241, 264, 265, 270, 296, 297, 322, 329, và 331 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, đột biến ở một hoặc nhiều vị trí 318, 320, và 322 theo cách đánh số EU của IgG1 người được sử dụng. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và/hoặc 235 được thay thế bằng alanin và/hoặc vị trí 329 được thay thế bằng glyxin. Trong một số kháng thể, các vị trí 234 và 235 được thay thế bằng alanin, chẳng hạn như trong SEQ ID NO: 102. Trong một số kháng thể, isotyp này là IgG2 hoặc IgG4 người.

Vùng hằng định kapa chuỗi nhẹ của người điển hình có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 104. Arginin đầu cùng N của SEQ ID NO: 104 có thể được loại bỏ, trong trường hợp đó vùng hằng định kapa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 105. Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 của người điển hình có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 101 (có hoặc không có lysin đầu cùng C). Các kháng thể có thể được biểu hiện dưới dạng các tetrame chứa hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng, dưới dạng các chuỗi nặng, các chuỗi nhẹ riêng biệt, như là Fab, Fab', F(ab')2, và Fv, hoặc dưới dạng các kháng thể chuỗi đơn trong đó các vùng biến đổi trưởng thành chuỗi nặng và nhẹ được nối qua đoạn đệm.

Các vùng hằng định của người thể hiện biến đổi kiểu alen và biến đổi kiểu alen đẳng tính giữa các cá thể khác nhau, nghĩa là, các vùng hằng định có thể khác nhau ở các cá thể

khác nhau ở một hoặc nhiều vị trí đa hình. Alen khác với alen đẳng tính ở chỗ huyết thanh nhận biết alen đẳng tính liên kết với vùng không đa hình của một hoặc nhiều isotyp khác. Do đó, ví dụ, một vùng hằng định chuỗi nặng khác là thuộc alen IgG1 G1m3 và có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 103. Một vùng hằng định chuỗi nặng khác thuộc alen IgG1 G1m3 có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 102 (có hoặc không có lysin đầu cùng C). Việc đề cập đến vùng hằng định của người bao gồm vùng hằng định với alen tự nhiên bất kỳ hoặc hoán vị bất kỳ của các gốc chiếm các vị trí trong các alen 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 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 điển hình được mô tả trong công bố patent Mỹ số US 2005/0009150 bởi Schenk và đồng tác giả (sau đây gọi là "Schenk"). Các trình tự từ nhiều dòng, thu được độc lập có thể được so sánh để đảm bảo không có các thay đổi được đưa vào trong quá trình khuếch đại. Trình tự của vùng VH cũng có thể được xác định hoặc được xác nhận bằng cách giải trình tự đoạn VH thu được bằng hệ phương pháp 5' RACE RT-PCR và đoạn 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 không phải người khác). Các trình tự điển hình mã hóa các vùng hằng định của người bao gồm SEQ ID NO: 106, mã hóa vùng hằng định IgG1 của người (SEQ ID NO: 103), và

SEQ ID NO: 107 và 108, mã hóa các vùng hằng định chuỗi nhẹ kapa của người (SEQ ID NO: 104 và 105, tương ứng).

Trong một phương pháp tiếp cận, vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ được thao tác di truyền lại để mã hóa các trình tự cho nối xuôi dòng của các khớp nối VDJ hoặc VJ tương ứng và được tách dòng vào vectơ biểu hiện của động vật có vú, chẳng hạn như pCMV-h1 đối với chuỗi nặng và pCMV-Mcl đối với chuỗi nhẹ. Các vectơ này mã hóa các vùng hằng định 1 và Ck của người như các đoạn exon xuôi dòng của caset vùng biến đổi đã được gắn xen. Sau khi kiểm tra trình tự, vectơ biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được đồng chuyển nhiễm vào tế bào CHO để tạo ra các kháng thể khảm. Môi trường có điều kiện được thu gom 48 giờ sau chuyển nhiễm và được thử nghiệm bằng phân tích thẩm tách Western 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 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 trong các sinh vật chủ như là các episom hoặc hoặc 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 tế bào đã được biến nạp bằng các trình tự ADN mong muốn.

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

từ alcohol dehydrogenaza, isocytocrom C, và các enzym chịu trách nhiệm về việc sử dụng maltoza và galactoza.

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

Ngoài ra, các trình tự mã hóa kháng thể có thể được đưa vào các gen chuyển để đưa vào bộ gen của động vật chuyển gen và biểu hiện tiếp trong sữa của động vật chuyển gen này (xem, ví dụ, patent Mỹ số 5,741,957; patent Mỹ số 5,304,489; và patent Mỹ số 5,849,992). Các gen chuyển thích hợp bao gồm các trình tự mã hóa cho chuỗi nhẹ và/hoặc nặng được liên kết chức năng với trình tự khởi động và yếu tố tăng cường từ gen đặc hiệu tuyến vú, chẳng hạn như casein hoặc beta lactoglobulin.

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

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

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

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

Thử nghiệm sàng lọc kháng thể

Các kháng thể có thể được sàng lọc bằng một số kỹ thuật sàng lọc bao gồm các thử nghiệm liên kết, kỹ thuật sàng lọc chức năng, sàng lọc trong mô hình động vật mắc bệnh liên quan đến các lắng đọng TTR, và các thử nghiệm lâm sàng. Các thử nghiệm liên kết kiểm tra khả năng liên kết đặc hiệu và, tùy ý, ái lực và tính đặc hiệu epitop với TTR monome hoặc một đoạn của nó. Ví dụ, các thử nghiệm liên kết có thể sàng lọc các kháng thể liên kết với các gốc axit amin 89-97 (SEQ ID NO: 113) của TTR, mà là epitop bị lấp trong tetrame TTR tự nhiên và bị bộc lộ ra trong dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR. Các kháng thể cũng có thể được sàng lọc về khả năng liên kết với các cấu hình tiền sợi, không tự nhiên của TTR và các sợi TTR dạng tinh bột nhưng không liên kết với các cấu hình TTR tự nhiên. Ví dụ, các kháng thể có thể được sàng lọc về khả năng

liên kết với dạng monome của TTR được tạo ra bằng cách phân ly hoặc hoặc phân rã TTR tetrame tự nhiên, và có thể được sàng lọc ngược dựa trên TTR tetrame tự nhiên, như được mô tả trong các ví dụ hoặc các phần khác. Tương tự, các kháng thể cũng có thể được sàng lọc về khả năng phản ứng miễn dịch của chúng trên mô bị thoái hóa dạng tinh bột do TTR nhưng không phản ứng miễn dịch trên mô khỏe mạnh. Các kỹ thuật sàng lọc này đôi khi được thực hiện cạnh tranh với kháng thể đối chứng, chẳng hạn như kháng thể có các vùng biến đổi của 9D5 hoặc 14G8 (isotyp IgG1 kapa). Tùy ý, kháng thể này hoặc đích TTR được bất động trong thử nghiệm này.

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

Các thử nghiệm chức năng khác có thể được thực hiện trong dung dịch, chẳng hạn như kiểm tra kháng thể có khả năng phá vỡ hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR hay không khi các chất trung gian TTR monome hoặc TTR bị cuộn gấp sai trong dung dịch được cho tiếp xúc với kháng thể này. Mức độ tạo sợi có thể được thăm dò bằng các phép đo độ đục, ví dụ, ở 400 nm trên máy đo phổ UV-khả kiến được lắp bộ phận điều khiển nhiệt độ. Thioflavin-T cũng có thể được sử dụng để đánh giá mức độ tạo sợi tinh bột. Ví dụ, lượng dư năm lần phân tử gam Thioflavin-T có thể được bổ sung vào các mẫu TTR và để ở nhiệt độ phòng trong 30 phút trước khi thực hiện các phép đo. Huỳnh quang Thioflavin-T có thể được theo dõi bằng cách sử dụng máy đo phổ huỳnh quang. Xem US 2014/0056904.

Kỹ thuật sàng lọc mô hình động vật kiểm tra khả năng của kháng thể trong việc điều trị phòng hoặc chữa các dấu hiệu hoặc triệu chứng trong mô hình động vật mô phỏng bệnh liên quan đến sự tích tụ TTR hoặc các lắng đọng TTR ở người. Các bệnh này bao gồm các dạng của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, chẳng hạn như bệnh thoái hóa dạng tinh bột

toàn thân do tuổi già (SSA), bệnh thoái hóa dạng tinh bột tim do tuổi già (SCA), bệnh viêm đa dây thần kinh do dạng tinh bột có tính gia đình (FAP), bệnh cơ tim dạng tinh bột có tính gia đình (FAC), và bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (CNSA). Các dấu hiệu hoặc triệu chứng thích hợp mà có thể được theo dõi bao gồm sự có mặt và mức độ của các lắng đọng dạng tinh bột trong nhiều mô khác nhau, chẳng hạn như đường tiêu hóa hoặc tim. Mức độ giảm các lắng đọng dạng tinh bột có thể được xác định bằng cách so sánh với đối chứng thích hợp, như mức nồng độ của các lắng đọng tinh bột TTR ở động vật đối chứng đã nhận được kháng thể đối chứng (ví dụ, kháng thể đối chứng phù hợp isotyp), giả dược, hoặc hoàn toàn không điều trị. Mô hình động vật điển hình để kiểm tra tác dụng chống lại bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR là mô hình chuột mang đột biến vô dụng ở locut *Ttr* chuột nội sinh và gen *TTR* đột biến của người chứa đột biến V30M liên quan đến bệnh đa dây thần kinh dạng tinh bột có tính gia đình. Xem, ví dụ, Kohno và đồng tác giả, Am. J. Path. 150(4):1497-1508 (1997); Cardoso và Saraiva, FASEB J 20(2):234-239 (2006). Các mô hình tương tự cũng tồn tại, bao gồm các mô hình khác cho dạng có tính gia đình của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và các mô hình cho các dạng đơn phát của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Xem, ví dụ, Teng và đồng tác giả, Lab. Invest. 81(3): 385-396 (2001); Ito và Maeda, Mouse Models of Transthyretin Amyloidosis, in Recent Advances in Transthyretin Evolution, Structure, và Biological Functions, trang 261-280 (2009) (Springer Berlin Heidelberg). Các động vật chuyển gen có thể mang gen chuyển TTR của người, chẳng hạn như gen chuyển TTR có đột biến liên quan đến bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR hoặc gen chuyển TTR kiểu dại. Để tạo thuận lợi cho việc kiểm tra trong mô hình động vật, các kháng thể khảm có vùng hằng định thích hợp cho mô hình động vật này có thể được sử dụng (ví dụ, các thể khảm chuột nhắt-chuột cống có thể được sử dụng để kiểm tra các kháng thể ở chuột cống). Có thể kết luận là dạng được làm tương thích với người của kháng thể sẽ là hữu hiệu nếu kháng thể chuột hoặc kháng thể khảm tương ứng là hữu hiệu trong mô hình động vật thích hợp và kháng thể được làm tương thích với người này có ái lực liên kết tương tự (ví dụ, trong khoảng sai số thí nghiệm, chẳng hạn như bởi hệ số là 1,5, 2, hoặc 3).

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

Axit nucleic

Sáng chế còn đề xuất các axit nucleic mã hóa bất kỳ trong số các chuỗi nặng và nhẹ được mô tả trên đây (ví dụ, SEQ ID NO: 40, 42, 44-56, 87, 89, 91-96, và 106-108). Tùy ý, các axit nucleic này mã hóa thêm peptit tín hiệu và có thể được biểu hiện với peptit tín hiệu được liên kết với vùng hằng định (ví dụ, các peptit tín hiệu có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 41 và 88 (chuỗi nặng) và 43 và 90 (chuỗi nhẹ) mà có thể được mã hóa lần lượt bởi SEQ ID NO: 40 và 87 (chuỗi nặng) và 42 và 89 (chuỗi nhẹ)). 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 chồng lặp. Các axit nucleic mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ có thể được nối như 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.

Các kháng thể liên hợp

Các kháng thể liên hợp mà liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên được bộc lộ trong các dạng gây bệnh của TTR nhưng không được bộc lộ trong các dạng tetrame tự nhiên của TTR, chẳng hạn như các gốc axit amin 89-97 (SEQ ID NO: 113) của TTR, là hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR; theo dõi và đánh giá hiệu quả của các dược chất đang được sử dụng để điều trị cho các người bệnh đã được chẩn đoán mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR; ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR; ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR; làm giảm hoặc đào thải các lắng đọng TTR; làm ổn định cấu hình không độc của TTR; hoặc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR ở người bệnh. Ví dụ, các kháng thể này có thể được liên hợp với các gốc điều trị khác, các protein khác, các kháng thể khác, và/hoặc các nhãn phát hiện được. Xem WO 03/057838; US 8,455,622.

Các gốc điều trị được liên hợp có thể là chất bất kỳ mà có thể được sử dụng để điều trị, chống, làm giảm, ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh hoặc tình trạng không mong muốn ở người bệnh, chẳng hạn như bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Các gốc điều trị có thể bao

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

Ví dụ về các gốc điều trị thích hợp bao gồm các dược chất làm giảm mức nồng độ của TTR, làm ổn định cấu trúc tetrame tự nhiên của TTR, ức chế sự tích tụ TTR, phá vỡ sự tạo sợi TTR hoặc dạng tinh bột TTR, hoặc trung hòa độc tính tế bào. Xem, ví dụ, Almeida và Saraiva, FEBS Letters 586:2891-2896 (2012); Saraiva, FEBS Letters 498:201-203 (2001); Ando và đồng tác giả, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013); Ruberg và Berk, Circulation 126:1286-1300 (2012); và Johnson và đồng tác giả, J. Mol. Biol. 421(2-3):185-203 (2012). Ví dụ, các kháng thể có thể được liên hợp với tafamidis, diflunisal, ALN-TTR01, ALNTTR02, ISIS-TTRRx, doxycyclin (doxy), axit tauroursodeoxycholic (TUDCA), Doxy-TUDCA, epigallocatechin gallate (EGCG), curcumin, hoặc resveratrol (3,5,4'-trihydroxystilbene). Các gốc điều trị điển hình khác bao gồm các chất khác đã được biết là hữu ích để điều trị, quản lý, hoặc cải thiện bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR hoặc các triệu chứng của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR. Xem, ví dụ, Ando và đồng tác giả, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013) về các triệu chứng lâm sàng phổ biến của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR và các chất điển hình được sử dụng để điều trị các triệu chứng này.

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 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 disulfit. Fynomer có thể được thao tác di truyền để liên kết với các phân tử đích có ái lực và tính đặc hiệu tương tự với các kháng thể. Chúng là thích hợp để tạo ra các protein dung hợp đa đặc hiệu dựa trên các kháng thể. Ví dụ,

Fynomer có thể được dung hợp với các đầu cùng N và/hoặc đầu cùng C của các kháng thể để tạo ra FynomAbs đặc hiệu kép và đặc hiệu ba với các cấu trúc khác nhau. Các Fynomer có thể được lựa chọn bằng cách sử dụng các thư viện Fynomer bằng các công nghệ sàng lọc sử dụng các thử nghiệm FACS, Biacore, và thử nghiệm dựa trên tế bào cho phép lựa chọn đủ Fynomer có các đặc điểm tối ưu. Ví dụ về các Fynomer được mô tả trong Grabulovski và đồng tác giả, J. Biol. Chem. 282:3196-3204 (2007); Bertschinger và đồng tác giả, Protein Eng. Des. Sel. 20:57-68 (2007); Schlatter và đồng tác giả, MAbs. 4:497-508 (2011); Banner và đồng tác giả, Acta. Crystallogr. D. Biol. Crystallogr. 69(Pt6):1124-1137 (2013); và Brack và đồng tác giả, Mol. Cancer Ther. 13:2030-2039 (2014).

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

Các kháng thể cũng có thể được kết hợp với nhãn phát hiện được. Các kháng thể này có thể được sử dụng, ví dụ, để chẩn đoán bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, để theo dõi sự tiến triển của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, và/hoặc để đánh giá hiệu quả của điều trị. Các kháng thể này là đặc biệt hữu ích để thực hiện các phép xác định này ở người bệnh mắc hoặc có nguy cơ bị mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, hoặc trong các mẫu sinh học thích hợp thu được từ các đối tượng này. Các nhãn phát hiện được điển hình mà có thể được kết hợp hoặc liên kết với kháng thể bao gồm nhiều loại enzym khác nhau, chẳng hạn như peroxidaza của cây cải ngựa, phosphataza kiềm, beta-galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; các nhóm prosthetic, như streptavidin/biotin và avidin/biotin; các nguyên liệu huỳnh quang, chẳng hạn như umbelliferon, floresxein, floresxein isothioxyanat, rođamin, diclorotriazinylamin floresxein, dansyl clorua hoặc phycoerythrin; các nguyên liệu phát quang, chẳng hạn như luminol; các nguyên liệu phát quang sinh học, chẳng hạn như luxiferaza, luxiferin, và aequorin; các nguyên liệu có hoạt tính phóng xạ, chẳng hạn như yttrium^{90} (90Y), bạc phóng xạ-111, bạc phóng xạ-199, Bismut^{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), flor (^{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 hợp với các đồng vị phóng xạ đặc hiệu.

Sự liên kết các đồng vị phóng xạ với các kháng thể có thể được thực hiện bằng các chelat hai chức thông thường. Đối với liên kết bạc phóng xạ-111 và bạc phóng xạ-199, các cầu nối dựa trên lưu huỳnh có thể được sử dụng. Xem Hazra và đồng tác giả, Cell Biophys. 24-25:1-7 (1994). Liên kết của các đồng vị phóng xạ bạc có thể bao gồm khử globulin miễn dịch bằng axit ascorbic. Đối với các đồng vị phóng xạ chẳng hạn 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 và đồng tác giả, "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy," trong Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld và đồng tác giả (eds.), trang 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom và đồng tác giả, "Antibodies For Drug Delivery," trong Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson và đồng tác giả (eds.), trang 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," trong Monoclonal Antibodies 84: Biological và Clinical Applications, Pinchera và đồng tác giả (eds.), trang 475-506 (1985); "Analysis, Results, và Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy," trong Monoclonal Antibodies For Cancer Detection and Therapy, Baldwin và đồng tác giả (eds.), trang 303-16 (Academic Press 1985); và Thorpe và đồng tác giả, Immunol. Rev., 62:119-58 (1982). Các cầu nối thích hợp bao gồm, ví dụ, các cầu nối cắt được và không cắt được. Các cầu nối khác nhau mà giải phóng các gốc điều trị, các protein, các kháng thể và/hoặc các nhãn phát hiện được đã kết hợp trong các điều kiện axit hóa hoặc khử, khi tiếp xúc với các proteaza đặc hiệu, hoặc trong các điều kiện xác định khác có thể được sử dụng.

Các ứng dụng điều trị

Các kháng thể trên đây có thể được sử dụng để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh ở người bệnh mắc hoặc có nguy cơ mắc bệnh bị gây ra ít nhất một phần bởi transthyretin

(TTR), và cụ thể là bởi dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR. Mặc dù sự hiểu biết về cơ chế là không cần thiết cho việc thực hành, tin rằng bất kỳ hoặc toàn bộ các cơ chế sau đây có thể góp phần vào việc điều trị bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR sử dụng các kháng thể trên đây: tác dụng ức chế sự kết tụ và tạo sợi TTR do kháng thể, tác dụng ổn định cấu hình không độc của TTR (ví dụ, các dạng tetrame) do kháng thể, hoặc tác dụng đào thải TTR kết tụ, TTR oligome, TTR monome do kháng thể. Các thể liên hợp kháng thể-dược chất có thể có các cơ chế tác dụng khác nữa được quyết định bởi gốc được liên hợp này.

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

Tần số sử dụng phụ thuộc vào thời gian bán thải của kháng thể trong hệ tuần hoàn, tình trạng của người bệnh 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 người bệnh 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 liều điển hình là hàng ngày đến hàng tháng, mặc dù cũng có thể sử dụng liều thường xuyên hơn hoặc ít thường xuyên hơn.

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

duy nhất, tùy ý ở dạng được chia nhỏ, là đủ cho rối loạn cấp tính hoặc tình trạng trầm trọng cấp tính của rối loạn mãn tính. Việc điều trị có thể được lặp lại cho sự tái phát của rối loạn cấp tính hoặc tình trạng trầm trọng cấp tính. Đối với các rối lạn 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 người bệnh.

Dược phẩm và phương pháp sử dụng

Được mô tả ở đây là một số phương pháp chẩn đoán, theo dõi, điều trị hoặc phòng ngừa bệnh hoặc tình trạng bị gây ra ít nhất một phần bởi transthyretin (TTR), và cụ thể là bởi dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR). Ví dụ về các bệnh này bao gồm bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR có tính gia đình, chẳng hạn như bệnh cơ tim dạng tinh bột có tính gia đình (FAC), bệnh viêm đa dây thần kinh do dạng tinh bột có tính gia đình (FAP), hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột chọn lọc hệ thần kinh trung ương (CNSA), và bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR đơn phát, chẳng hạn như bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già (SSA) hoặc bệnh thoái hóa dạng tinh bột tim do tuổi già (SCA). Các kháng thể được mô tả trên đây có thể được đưa vào dược phẩm để sử dụng trong các phương pháp này. Nói chung, kháng thể hoặc dược phẩm chứa kháng thể được sử dụng cho đối tượng cần nó. Các người bệnh phải điều trị bao gồm các cá thể có nguy cơ mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR nhưng chưa thể hiện các triệu chứng, cũng như các người bệnh đang có triệu chứng. Một số người bệnh có thể được điều trị trong giai đoạn tiền triệu của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR.

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

Các cá thể mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR đôi khi có thể được nhận diện nhờ các biểu hiện lâm sàng của bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, bao gồm một hoặc nhiều biểu hiện sau đây: (1) tiền sử gia đình mắc bệnh thần kinh, đặc biệt là liên quan đến bệnh suy tim; (2) bệnh đau thần kinh hoặc các rối loạn cảm giác tiến triển có nguyên nhân chưa rõ; (3) hội chứng ống cổ tay không có nguyên nhân rõ ràng, đặc biệt là nếu nó ở cả hai bên và đòi hỏi phải phẫu thuật; (4) các rối loạn vận động dạ dày ruột hoặc rối loạn thần kinh thực vật có nguyên nhân chưa rõ (ví dụ, rối loạn cương cứng, tụt huyết áp tư thế đứng, rối loạn bàng quang do bệnh thần kinh); (5) bệnh tim được đặc trưng bởi thành tâm thất bị dày lên mà không tăng huyết áp; (6) chẹn nhĩ thất tiến triển có nguyên nhân chưa rõ, đặc biệt là khi kèm theo tim bị dày lên; và (6) thể vùi trong dịch thủy tinh kiểu bông-len. Xem Ando và đồng tác giả, Orphanet Journal of Rare Diseases 8:31 (2013). Tuy nhiên, chẩn đoán chính thức bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR thường dựa vào các mẫu sinh thiết cơ quan đích, sau đó nhuộm mô học mô đã cắt ra bằng thuốc nhuộm đặc hiệu tinh bột, đỏ Congo. Nếu thí nghiệm dương tính với tinh bột được quan sát thấy, bước nhuộm hóa học mô miễn dịch đối với TTR được thực hiện tiếp để đảm bảo là protein tiền chất chịu trách nhiệm về sự tạo tinh bột thực sự là TTR. Đối với các dạng có tính gia đình của các bệnh này, việc chứng minh có đột biến trong gen mã hóa TTR sau đó là cần thiết trước khi chẩn đoán chính thức được thực hiện.

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

Khi đã được xác nhận bởi tiền sử gia đình, xét nghiệm di truyền, hoặc sàng lọc y tế đối với bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR, việc điều trị có thể bắt đầu ở độ tuổi bất kỳ (ví dụ, 20, 30, 40, 50, 60, hoặc 70 tuổi). Việc điều trị thường đòi hỏi nhiều liều trong một khoảng thời gian và có thể được theo dõi bằng cách phân tích đáp ứng kháng thể hoặc tế

bào T hoạt hóa hoặc tế bào B với dược chất (ví dụ, dạng bị cắt của TTR chứa các gốc axit amin 89-97) theo thời gian. Nếu đáp ứng này giảm, liều cao hơn được chỉ định.

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

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

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

các người bệnh được chẩn đoán mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR; gây đáp ứng miễn dịch bao gồm kháng thể với TTR ở đối tượng; làm chậm sự xuất hiện của tình trạng liên quan đến tích lũy TTR dạng tinh bột ở đối tượng; hoặc điều trị hoặc phòng ngừa bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR ở người bệnh.

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

Khoảng liều điển hình đối với kháng thể có thể là từ khoảng 0,1-20, hoặc 0,5-5 mg/kg thể trọng (ví dụ, 0,5, 1, 2, 3, 4 hoặc 5 mg/kg) hoặc 10-1500 mg dưới dạng liều cố định. Liều này phụ thuộc vào tình trạng của người bệnh và đáp ứng với điều trị trước đó, nếu có, dù điều trị này là phòng ngừa hay chữa bệnh và dù rối loạn này là cấp tính hay mãn tính, trong số các yếu tố khác.

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

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

Dược phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hóa có thể là vô trùng và gần như đẳng trương (250-350 mOsm/kg nước) và được sản xuất trong các điều kiện GMP. Dược phẩm có thể được cung cấp ở dạng liều đơn vị (nghĩa là, liều để sử dụng một lần duy nhất). Dược phẩm có thể được bào chế bằng cách sử dụng một hoặc nhiều chất mang, chất pha loãng, tá dược hoặc chất phụ gia được chấp nhận về mặt sinh lý. Dạng bào chế phụ thuộc vào đường sử dụng đã chọn. Để tiêm, kháng thể có thể được bào chế thành dung dịch nước, ví dụ, trong các dung dịch đệm phù hợp về sinh lý chẳng hạn như dung dịch Hank, dung dịch

Ringer, hoặc nước muối sinh lý hoặc dung dịch đệm axetat (để làm giảm sự khó chịu ở vị trí tiêm). Dung dịch này có thể chứa tá dược chẳng hạn như các chất tạo huyền phù, chất ổn định và/hoặc phân tán. Ngoài ra, các kháng thể có thể ở dạng đông khô để hoàn nguyên với tá dược lỏng thích hợp, ví dụ, nước vô trùng không chứa chất gây sốt, trước khi sử dụng.

Các phác đồ có thể được sử dụng kết hợp với một chất khác hữu hiệu để điều trị hoặc phòng ngừa bệnh đang được điều trị. Các chất này có thể bao gồm siARN để ức chế sự biểu hiện của TTR hoặc Vyndaqel, chất làm ổn định TTR ở cấu hình tetrame.

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

Mức nồng độ dạng tinh bột TTR có thể được đo bằng nhiều phương pháp, bao gồm các kỹ thuật chụp ảnh. Ví dụ về các kỹ thuật chụp ảnh thích hợp bao gồm quét PET với TTR được đánh dấu phóng xạ hoặc các đoạn của nó, các kháng thể TTR hoặc các đoạn của nó, các chất chụp ảnh dạng tinh bột dựa trên đỏ Congo, chẳng hạn như, ví dụ, PIB (US 2011/0008255), peptit chụp ảnh dạng tinh bột p31 (sự phân phối sinh học của peptit chụp ảnh dạng tinh bột, p31, có tương quan với việc định lượng dạng tinh bột dựa trên việc nhuộm mô bằng đỏ Congo, Wall và đồng tác giả, tóm tắt số 1573, 2011 ISNM Annual Meeting), và các nhãn PET khác. Mức nồng độ dạng không tự nhiên của TTR có thể đo được, ví dụ, bằng cách thực hiện các thử nghiệm SDS-PAGE/thẩm tách Western hoặc thử nghiệm đĩa Meso Scale Discovery với các kháng thể được mô tả ở đây trên các mẫu huyết

tương hoặc mẫu sinh thiết của đối tượng và so sánh với các mẫu đối chứng, như được mô tả trong các ví dụ.

Các phương pháp chẩn đoán và theo dõi

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

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

Cũng được mô tả là các phương pháp phát hiện dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR ở đối tượng, ví dụ, bằng cách đo dạng tinh bột TTR hoặc các dạng gây bệnh của TTR (ví dụ, dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR) trong mẫu từ đối tượng hoặc bằng cách chụp ảnh *in vivo* TTR ở đối tượng. Các phương pháp này là hữu ích để chẩn đoán hoặc xác nhận chẩn đoán các bệnh liên quan đến các dạng gây bệnh của TTR này (ví dụ, bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR), hoặc khả năng

bị nhiễm bệnh này. Các phương pháp này cũng có thể được sử dụng trên các đối tượng không có triệu chứng. Sự có mặt của dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR chỉ ra khả năng dễ bị mắc bệnh có triệu chứng trong tương lai. Các phương pháp này cũng là hữu ích để theo dõi sự tiến triển và/hoặc đáp ứng của bệnh với phương pháp điều trị ở các đối tượng đã được chẩn đoán trước đó là mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột TTR.

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

Các phương pháp chụp ảnh *in vivo* có thể có hiệu quả bằng cách sử dụng chất phản ứng, chẳng hạn như kháng thể liên kết với dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR ở đối tượng này, và sau đó phát hiện chất phản ứng này sau khi nó đã liên kết. Các kháng thể này thường liên kết với epitop trong các gốc 89-97 của TTR. Nếu muốn, đáp ứng đào thải có thể tránh được bằng cách sử dụng các đoạn kháng thể thiếu vùng hằng định có chiều dài đầy đủ, chẳng hạn như Fab. Trong một số phương pháp, cùng một kháng thể có thể đóng cả vai trò chất phản ứng điều trị và chẩn đoán.

Các chất phản ứng chẩn đoán có thể được sử dụng bằng cách tiêm tĩnh mạch vào cơ thể của đối tượng, hoặc bằng cách đường hợp lý khác. Liều của chất phản ứng nên nằm trong các khoảng giống như đối với các phương pháp điều trị. Thông thường, chất phản

ứng này được đánh dấu, mặc dù trong một số phương pháp, chất phản ứng chính có ái lực với dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR không được đánh dấu và chất đánh dấu phụ được sử dụng để liên kết với chất phản ứng chính này. Việc lựa chọn nhãn phụ thuộc vào cách thức phát hiện. Ví dụ, nhãn huỳnh quang là thích hợp để phát hiện bằng mắt thường. Việc sử dụng các nhãn thuận từ là thích hợp để phát hiện bằng cách chụp X quang mà không cần can thiệp phẫu thuật. Các nhãn có hoạt tính phóng xạ cũng có thể được phát hiện bằng cách sử dụng PET hoặc SPECT.

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

Kit

Sáng chế còn đề xuất 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 sử dụng (ví dụ, phụ kiện kèm theo bao gói). Các hướng dẫn sử dụng có thể bao gồm, ví dụ, các hướng dẫn để sử dụng kháng thể và tùy ý một hoặc nhiều chất bổ sung. Các đồ bao gói chứa kháng thể có thể là các liều đơn vị, các gói gộp (ví dụ, gói nhiều liều), hoặc các liều dưới đơn vị.

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

Kit cũng có thể chứa đồ bao gói thứ hai chứa dung dịch đệm dược dụng, chẳng hạn như nước kìm khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó cũng có thể chứa các nguyên liệu khác được mong muốn 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 dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của transthyretin (TTR), hoặc các đoạn của nó, trong ngữ cảnh điều trị hoặc chẩn đoán lâm sàng hoặc trong nghiên cứu. Ví dụ, các kháng thể này có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR trong mẫu sinh học như là dấu hiệu chỉ ra rằng mẫu sinh học này chứa các lắng đọng dạng tinh bột TTR. Sự liên kết của các kháng thể này với mẫu sinh học có thể được so sánh với khả năng liên kết của các kháng thể với mẫu đối chứng. Mẫu đối chứng này và mẫu sinh học này có thể chứa tế bào có cùng nguồn gốc mô. Các mẫu đối chứng và các mẫu sinh học có thể thu được từ cùng một cá thể hoặc nhiều cá thể khác nhau và tại cùng một thời điểm hoặc vào nhiều thời điểm khác nhau. Nếu muốn, nhiều mẫu sinh học và nhiều mẫu đối chứng được đánh giá vào nhiều thời điểm để bảo vệ chống lại sự biến thiên ngẫu nhiên không phụ thuộc vào các chênh lệch giữa các mẫu này. Sau đó so sánh trực tiếp có thể được thực hiện giữa (các) mẫu sinh học này và (các) mẫu đối chứng này để xác định khả năng liên kết của kháng thể (nghĩa là, sự có mặt của dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR) với (các) mẫu sinh học được gia tăng, giảm đi hay giữ nguyên so với khả năng liên kết của kháng thể với (các) mẫu đối chứng. Khả năng liên kết của kháng thể với (các) mẫu sinh học tăng lên so với (các) mẫu đối chứng chỉ ra sự có mặt của dạng monome, bị cuộn gấp sai, kết tụ hoặc dạng sợi của TTR trong (các) mẫu sinh học này. Trong một số trường hợp, sự liên kết của kháng thể tăng lên có ý nghĩa thống kê. Tùy ý, sự liên kết của kháng thể với mẫu sinh học cao hơn ít nhất là 1,5 lần, 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 10 lần, 20 lần, hoặc 100 lần so với khả năng liên kết của kháng thể này với mẫu đối chứng.

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

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

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

Các kháng thể cũng có thể được sử dụng để ức chế hoặc làm giảm sự tích tụ TTR, ức chế hoặc làm giảm sự tạo sợi TTR, làm giảm hoặc đào thải các lắng đọng TTR hoặc các khối kết tụ TTR, hoặc làm ổn định các cấu hình không độc của TTR trong mẫu sinh học. Mẫu sinh học này có thể bao gồm, ví dụ, máu, huyết thanh, huyết tương, hoặc mô (ví dụ,

mô từ tim, hệ thần kinh ngoại biên, hệ thần kinh thực vật, thận, mắt, hoặc đường tiêu hóa). Trong một số trường hợp, sự kết tụ TTR, sự tạo sợi TTR, hoặc các lắng đọng TTR bị ức chế hoặc làm giảm ít nhất là 10%, 20%, 25%, 30%, 40%, 50%, hoặc 75%, (ví dụ, 10%-75% hoặc 30%-70%). Các thử nghiệm phát hiện sự tạo sợi được mô tả ở các phần khác ở đây. Cũng xem US 2014/0056904.

Tất cả các 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 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. Nhận dạng các kháng thể đơn dòng TTR-lỗi

Các kháng thể đơn dòng đặc hiệu cấu hình kháng dạng monome, dạng cuộn gấp sai, dạng sợi hoặc dạng kết tụ của TTR (TTR-lỗi) được tạo ra, sàng lọc, biểu hiện, và tinh chế như được mô tả trong phần Nguyên liệu và phương pháp (a-d). Để tạo ra kháng thể đơn dòng TTR-lỗi, cấu trúc tinh thể của TTR tetrame của người được kiểm tra để phát hiện các vùng của protein này bị lấp trong tetrame này, nhưng được bộc lộ khi tách tetrame này thành các tiểu đơn vị monome của nó. Vùng được nhận diện là các gốc 89-97 (EHAEVVFTA) (SEQ ID NO: 113) nằm trong sợi F của TTR và bị cô lập ở bề mặt phân cách đime của protein tetrame. Tra cứu BLAST cơ sở dữ liệu protein không tìm ra bất kỳ protein người nào khác có trình tự này.

Peptit chứa trình tự này (ggEHAEVVFTAggkg) (SEQ ID NO: 114), được tổng hợp. Các chữ cái viết hoa thể hiện các gốc 89-97 của TTR. Các chữ cái thường thể hiện các gốc cầu nối bổ sung được thêm vào để làm tăng độ tan của peptit kháng nguyên và để tạo ra đoạn 9 axit amin làm trình tự trong. Peptit này được liên kết với lõi poly-lysin dạng cây, tạo ra chất gây miễn dịch peptit đa kháng nguyên (TTR-MAP) chứa lõi gồm các gốc lysin có nhiều nhánh liên kết với peptit TTR 89-97. Các kháng thể được liệt kê trong bảng 2 được tạo ra kháng TTR-MAP.

Ngoài peptit đa kháng nguyên này, hai chất gây miễn dịch khác chứa cùng một đoạn TTR được tạo ra bằng cách liên kết đồng hóa trị các peptit TTR 89-97 tương tự (Ac-cggEHAEVVFTA-amit (SEQ ID NO: 115) và Ac-EHAEVVFTAcgg-amit (SEQ ID NO: 116)) qua các gốc xystein đầu cùng N và C với hemoxyanin hà có lỗ (keyhole limpet hemocyanin) (TTR89-97-N-KLH và TTR89-97-C-KLH).

Sau khi tạo kháng thể, sàng lọc, biểu hiện, và tinh chế kháng thể, các tham số động học liên kết chi tiết (tốc độ kết hợp (k_a), tốc độ phân ly (k_d), và hằng số ái lực liên kết (K_D)) được xác định cho các kháng thể TTR-lỗi dẫn đầu bằng Cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance: SPR) cho TTR F87M/L110M người tái tổ hợp, như được thể hiện trong bảng 2. IgG kháng chuột (GE Healthcare) được bất động trên chip cảm biến C5 (thiếu các chuỗi dextran) bằng cách tạo cặp với amin theo hướng dẫn được cung cấp trong kit kháng chuột GE Healthcare, và các mAb TTR-lỗi bị bắt giữ đến mức đảm bảo khả năng liên kết tối đa của chất cần phân tích là 30-50 RU. Các nồng độ khác nhau của chất cần phân tích (TTR F87M/L110M người tái tổ hợp) được cho qua phối tử bị bắt giữ ở tốc độ 30 µL/phút trong dung dịch đệm chạy (HBS + 0,05% P-20, 1 mg/mL BSA) trong các dung dịch pha loãng 3 lần. Với mỗi nồng độ, phản ứng xảy ra trong khung thời gian cho phép các nồng độ chất phân tích cao hơn đạt tới sự cân bằng trong quá trình kết hợp, cũng như ít nhất là 10% tín hiệu bị giảm trong quá trình phân ly. Ít nhất là một nồng độ (không phải nồng độ cao nhất hoặc thấp nhất) được chạy hai lần. Các khoảng nồng độ của chất cần phân tích được lựa chọn dựa vào thí nghiệm sơ bộ để mở rộng ít nhất là trên 10 lần giá trị K_D đến dưới 10 lần giá trị K_D.

Các kết quả của phân tích SPR về các mAb TTR-lỗi dẫn đầu được thể hiện trong bảng 2 dưới đây.

Bảng 2

Phân tích SPR về các kháng thể TTR-lỗi dẫn đầu liên kết với TTR người (F87M/L110M)

mAb	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	R_{max}
9D5	2,715E+4	4,930E-4	1,816E-8	31,55
14G8	2,880E+4	5,358E-4	1,861E-8	27,13
5A1	6,107E+4	4,693E-4	7,684E-9	30,98
6C1	4,607E+4	4,151E-4	9,010E-9	26,32

Ví dụ 2. Liên kết của kháng thể TTR-lỗi với kháng nguyên TTR

Bốn mAb TTR-lỗi dẫn đầu (9D5, 14G8, 6C1, và 5A1) được thử nghiệm bằng ELISA ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,31 đến 2,5 µg/mL bằng cách sử dụng TTR được xử lý ở độ pH=4,0 (pH4-TTR) và TTR tự nhiên làm kháng nguyên phủ. Chế phẩm kháng nguyên TTR và các quy trình ELISA được mô tả ở đoạn khác trong phần Nguyên liệu và phương pháp (e-g).

Các đường cong liên kết thu được và các giá trị K_d và B_{max} được lập bảng được thể hiện trong Fig.3 và bảng 3 dưới đây. Các kết quả trong Fig.3 được trình bày theo các đơn vị nhiệm ý (a.u.) trên trục y. Tất cả các mAb đều thể hiện khả năng liên kết đáng kể với pH4-TTR với các giá trị K_d nằm trong khoảng từ 16 nM (6C1) đến 282 nM (9D5). Các giá trị B_{max} đối với liên kết với pH4-TTR nằm trong khoảng từ thấp là 0,65 a.u. (14G8) đến cao là 2,02 (9D5). Ngược lại với sự liên kết với pH4-TTR, không có kháng thể nào thể hiện khả năng liên kết đáng kể với TTR tự nhiên, điều này chỉ ra là tất cả các kháng thể TTR được tạo ra đều đặc hiệu với các dạng không tự nhiên của TTR.

Bảng 3

Phân tích ELISA về các kháng thể TTR-lỗi dẫn đầu liên kết với pH4-TTR

mAb	K_d (nM)	B_{max} (a.u.)
9D5	282	2,02
14G8	108	0,65
6C1	16	1,07
5A1	23	1,61

Ví dụ 3. Phân tích các kháng thể TTR-lỗi bằng SDS-PAGE và Native-PAGE

9D5 và 14G8 được phân tích bằng SDS-PAGE/thẩm tách Western để chứng minh tính đặc hiệu liên kết với các dạng monome/biến tính của TTR so với TTR tự nhiên, không bị biến tính. Các quy trình SDS-PAGE, Native-PAGE, và Thẩm tách Western được mô tả ở đoạn khác trong phần Nguyên liệu và phương pháp (h-j).

TTR không bị biến tính hoặc pH4-TTR được chạy trên gel SDS-PAGE sát cạnh TTR bị biến tính bởi nhiệt và pH4-TTR bị biến tính bởi nhiệt. Sau khi điện di, gel này được thẩm tách Western lên nitroxenluloza và được nhuộm bằng TTR mAb 9D5 và 14G8. Cả hai kháng thể chỉ nhận diện được TTR khi nó được xử lý ở độ pH=4 hoặc khi TTR hoặc pH4-TTR được làm biến tính đầu tiên trước SDS-PAGE. Do đó 9D5 và 14G8 này thể hiện tính đặc hiệu với các conforme TTR được tạo ra bằng cách gây biến tính TTR hoặc bằng cách xử lý TTR ở độ pH=4.

6C1 và 5A1 cùng với toàn bộ TTR mAb (7G7, 8C3) và kháng thể đa dòng Sigma đã có trên thị trường cũng được phân tích bằng SDS-PAGE/thẩm tách Western. Mỗi vết chứa chất đánh dấu khối lượng phân tử đã nhuộm, TTR không bị biến tính, và pH4-TTR.

Gel SDS-PAGE đã nhuộm thể hiện là các dạng chính có mặt trong mẫu TTR không bị biến tính là đime ~38 kDa. Ngược lại, thành phần chính có mặt trong mẫu pH4-TTR chạy dưới dạng đime ~35 kDa với lượng nhỏ đime của monome ~15 kDa. Đime này chạy dưới dạng protein nhỏ hơn một chút so với đime có mặt trong mẫu TTR không bị biến tính, điều này chỉ ra sự khác biệt về cấu hình giữa hai dạng đime TTR này.

Các kỹ thuật thẩm tách Western TTR và pH4-TTR sử dụng bốn kháng thể TTR-lỗi chỉ ra rằng các mAb này không nhận diện được TTR không bị biến tính, nhưng liên kết được với cả monome và đime bị biến tính có mặt trong mẫu pH4-TTR. Do đó, bốn mAb TTR-lỗi (9D5, 14G8, 6C1, và 5A1) thể hiện tính đặc hiệu tương tự nhau đối với các cấu hình không tự nhiên của TTR khi được phân tích bằng SDS-PAGE/thẩm tách Western.

Ngược lại với bốn mAb TTR-lỗi, hai TTR mAb đối chứng, 7G7 và 8C3, được tạo ra bằng cách gây miễn dịch chuột bằng TTR nguyên vẹn nhận biết tất cả các dạng TTR có mặt trong các mẫu TTR và pH4-TTR, bao gồm các dạng TTR tetrame. Do đó, khác với mAb TTR-lỗi, các mAb đối chứng này liên kết với TTR nhưng không có tính đặc hiệu cấu hình. Kháng thể đa dòng Sigma hoạt động tương tự với các mAb đối chứng 7G7 và 8C3.

TTR và pH4-TTR cũng được chạy trên gel tự nhiên để xem bốn mAb TTR-lỗi có khả năng thể hiện tính đặc hiệu cấu hình trong các điều kiện gel không biến tính hay không. Trên gel Native PAGE được nhuộm, TTR chạy dưới dạng đime tự nhiên ~35 kDa với lượng nhỏ tetrame. Ngược lại, pH4-TTR chạy chủ yếu dưới dạng vết khối lượng phân tử cao với lượng rất nhỏ của đime ~35 kDa. Kháng thể đa dòng Sigma không đặc hiệu nhận diện tất cả các dạng TTR có mặt trong cả mẫu TTR và pH4-TTR. Ngược lại, 9D5 chỉ nhận biết các dạng TTR khối lượng phân tử cao có mặt trong mẫu pH4-TTR. Như được quan sát thấy trong thử nghiệm SDS-PAGE/thẩm tách Western, 9D5 không nhận biết bất kỳ trong số các dạng TTR tự nhiên.

Tất cả bốn mAb TTR-lỗi được phân tích tiếp bằng Native-PAGE/thẩm tách Western. Như đã mong đợi và tương tự với 9D5, các mAb TTR-lỗi còn lại, 14G8, 6C1, và 5A1, liên kết đặc hiệu với các dạng không tự nhiên có khối lượng phân tử cao của TTR có mặt trong mẫu pH4-TTR. Không có kháng thể nào nhận biết đime TTR tự nhiên ~35 kDa. Các kết quả này chỉ ra rằng bốn mAb TTR-lỗi này hoạt động tương tự nhau và chỉ nhận biết các loại TTR không tự nhiên mà khác biệt về cấu hình với TTR tự nhiên.

Ví dụ 4. Ức chế sự tạo sợi TTR bởi các kháng thể TTR-lỗi

TTR-Y78F là biến thể TTR chứa đột biến điểm ở vị trí 78 trong trình tự protein gây mất ổn định tetrame TTR. Theo thời gian và trong các điều kiện axit hóa nhẹ, biến thể TTR này phân ly thành các tiểu đơn vị monome của nó mà sau đó có thể tiếp tục kết tụ và tạo các sợi các khả năng liên kết với thioflavin-T. Do đó mức độ tạo sợi có thể được theo dõi bằng cách đo sự phát huỳnh quang thioflavin-T ở 480nm. Việc đưa vào kháng thể TTR-lỗi

đặc hiệu với các monome TTR đã phân ly hoặc các khối kết tụ sẽ ngăn ngừa sự lắp ghép các sợi TTR dẫn đến làm giảm sự phát huỳnh quang thioflavin-T so với phản ứng đối chứng không có kháng thể. Quy trình kiểm tra tác dụng ức chế sự tạo sợi TTR được mô tả ở đoạn khác trong phần Nguyên liệu và phương pháp (k).

Tất cả bốn kháng thể TTR-lỗi đều ức chế mạnh sự tạo thành các sợi TTR-Y78F phản ứng với thioflavin-T so với đối chứng isotyp. Các kết quả được thể hiện trong Fig.4A và được biểu diễn bằng đơn vị nhiệm ý (a.u.) trên trục y. Kháng thể TTR-lỗi 5A1 ức chế gần như hoàn toàn sự tạo sợi. Các kết quả này phù hợp với quan điểm là các kháng thể TTR-lỗi liên kết với các dạng monome và/hoặc kết tụ của TTR, do đó ngăn ngừa sự tạo sợi TTR.

Bảng 4 tổng kết số liệu đặc trưng thu được cho tập hợp 4 kháng thể TTR-lỗi (9D5, 14G8, 6C1, và 5A1) thể hiện tính chọn lọc cấu hình tốt đối với các dạng không tự nhiên của TTR. Các kháng thể này có ái lực (K_D) đối với pH4-TTR nằm trong khoảng từ 14,5 nM (6C1) đến 257 nM (9D5) và các giá trị B_{max} nằm trong khoảng từ 0,65 a.u. (14G8) đến 2,02 (9D5). Không có kháng thể nào trong số này nhận biết TTR tự nhiên, nhưng lại liên kết với pH4-TTR trên SDS-PAGE/thẩm tách Western và với các khối kết tụ TTR có khối lượng phân tử cao trên native-PAGE/thẩm tách Western. Các kháng thể này cũng ức chế sự tạo sợi TTR trong thử nghiệm tạo sợi sử dụng Thio-T làm chất chỉ thị.

Bảng 4

Bảng tổng kết đặc tính của mAB TTR-lỗi-Y78F

ID dòng	ELISA bánh kẹp (pH4-TTR)		Thẩm tách Western			% ức chế sợi (Thio-T)
	K_D (nM)	B_{max} (OD_{450} a.u.)	SDS-PAGE		Native (HMW-TTR)	
			(TTR)	(pH4-TTR)		

9D5	257	2,02	-	+++	+++	83
14G8	98,7	0,65	-	+++	++	65
6C1	14,6	1,07	-	+++	+++	72
5A1	21,3	1,61	-	+++	+++	100

TTR-V122I là biến thể TTR chứa đột biến điểm duy nhất ở vị trí 122 gây mất ổn định tetrame này. Sự tạo sợi có liên quan đến sự tăng phát huỳnh quang ThT. Các nồng độ mAb 14G8 tăng dần gây ra sự giảm dần đều sự phát huỳnh quang ThT thể hiện tác dụng ức chế dưới lượng hóa lượng pháp sự tạo sợi TTR (IC_{50}=0,028±0,009 mg/mL; n=3; Fig.4B và Bảng 4a). mAb đối chứng isotyp không gây tác dụng ức chế sự tạo sợi TTR (Fig.4C), do đó chứng minh tính đặc hiệu của tác dụng ức chế do 14G8.

Các giá trị IC_{50} dưới lượng hóa lượng pháp so sánh được được xác định cho 5A1 và 6C1 (Bảng 4a) gợi ý về các cơ chế ức chế sợi giống nhau đối với mỗi mAb TTR-lỗi trong số này. Ngược lại, 9D5 bất ngờ mất khả năng ức chế sự tạo sợi TTR-V122I, mặc dù thể hiện tính đặc hiệu và ái lực tương tự đối với TTR không tự nhiên. Vẫn phải thăm dò xem 9D5 có nhạy cảm hơn với các điều kiện thử nghiệm được sử dụng hay không.

Bảng 4a

Bảng tổng kết đặc tính của mAb TTR-lỗi-V122I

Kháng thể	IC_{50} ± SD (mg/mL)
9D5	Không ức chế
14G8	0,028 ± 0,009
6C1	0,048 ± 0,059
5A1	0,015 ± 0,02
EG 27/1	Không ức chế

Ví dụ 5. Mô tả đặc trưng hóa học mô miễn dịch (Immunohistochemical: IHC) của mô ATTR bằng cách sử dụng mAb TTR-lỗi

Các mAb TTR-lỗi dẫn đầu được tạo ra cho đoạn TTR 89-97 của protein transthyretin được kiểm tra hóa học mô miễn dịch trên mô được làm đông lạnh tươi và

được xử lý bằng parafin từ các người bệnh đã được xác nhận là mắc chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR ở tim. Các quy trình thu gom và chuẩn bị các mẫu mô tim, phân tích hóa học mô miễn dịch (IHC), và phân tích hình ảnh, được cung cấp ở đoạn khác trong phần Nguyên liệu và phương pháp (l-o). Các kháng thể được sử dụng cho IHC được mô tả trong bảng 5.

Bảng 5

Các kháng thể được sử dụng cho mô tả đặc tính hóa học mô miễn dịch

Kháng thể	Typ kháng thể	Nhà cung cấp	Nhuộm mô tim	Nồng độ
14G8	TTR-lỗi	Prothena Biosciences	Có	0,5 µg/mL
9D5	TTR-lỗi	Prothena Biosciences	Có	0,5 µg/mL
6C1	TTR-lỗi	Prothena Biosciences	Có	0,5 µg/mL
5A1	TTR-lỗi	Prothena Biosciences	Có	0,5 µg/mL
7G7	TTR	Prothena Biosciences	Có	0,5 µg/mL
6F10	Đối chứng isotyp	Prothena Biosciences	Không	0,5 µg/mL
Tiền albumin (A0002)	TTR	Dako North America	Có	1:2.000 & 1:20.000
Chuỗi nhẹ Kapa (A0191)	LC-	Dako North America	Không	1:8.000
Chuỗi nhẹ Lambđa (A0193)	LC-	Dako North America	Không	1:8.000
Dạng tinh bột A (M0759)	AA	Dako North America	Không	1:8.000

Các mẫu mô tim được thu gom từ các người bệnh đã được chẩn đoán xác nhận về các đột biến ATTR. Các thống kê nhân khẩu học cho các ca đã được kiểm tra về hóa học mô miễn dịch là như sau và được tổng kết trong bảng 6: FAC = bệnh cơ tim dạng tinh bột có tính gia đình; FAP = bệnh đa dây thần kinh dạng tinh bột có tính gia đình; 1° AL =

chứng thoái hóa dạng tinh bột chuỗi nhẹ; ATTR = chứng thoái hóa dạng tinh bột do transthyretin; Unk = Chưa biết

Bảng 6

Nhuộm hóa học mô miễn dịch các mẫu mô tim với các kháng thể TTR-lỗi

Ca	Chẩn đoán	Đột biến TTR	Dạng	Có được nhuộm với kháng thể TTR không?
Người bệnh 1	FAC	Ileu122	Đông lạnh	Có
Người bệnh 2	FAP	Kiểu dại	Đông lạnh	Có
Người bệnh 3	FAP	84Ser	Đông lạnh	Có
Người bệnh 4	FAP	84Ser	Đông lạnh	Có
Người bệnh 5	1° AL	--	Đông lạnh	Không
Người bệnh 6	1° AL	--	Đông lạnh	Không
Người bệnh 7	ATTR	10Arg	Đông lạnh	Có
Người bệnh 8	ATTR	V122I	Đông lạnh	Có
Người bệnh H1	ATTR	Val122Ile	FFPE	Có
Người bệnh H2	ATTR	Thr60Ala	FFPE	Có
Người bệnh H3	ATTR	Thr49Ala	FFPE	Có
Người bệnh H4	ATTR	Ile84Ser	FFPE	Có
Người bệnh H5	Unk.	bệnh tim do tuổi già	FFPE	Có
Người bệnh H6	ATTR	Ile84Ser	FFPE	Có

Các kháng thể đơn dòng chuột (các mAb TTR-lỗi) được tạo ra cho đoạn 89-97 của protein transthyretin được kiểm tra hóa học mô miễn dịch trên mô đông lạnh tươi và được xử lý bằng parafin từ các người bệnh đã được xác nhận là mắc chứng thoái hóa dạng tinh bột TTR ở tim. Mỗi kháng thể TTR-lỗi thể hiện khả năng phản ứng miễn dịch mạnh trên mô tim ATTR. Sự bắt màu tối được quan sát thấy trong các lắng đọng trong toàn bộ cơ tim và hệ mạch máu. Khi khả năng phản ứng miễn dịch được so sánh với việc nhuộm bằng Đỏ Congo chứa Thioflavin-T, phần lớn khả năng phản ứng miễn dịch trong mô này thể hiện sự phù hợp cao với lưỡng chiết quang đỏ Congo và sự nhuộm dương tính Thioflavin T.

Điều này xác nhận bản chất phiến gấp nếp beta của dạng tinh bột TTR bị lắng đọng trong mô này. 14G8, 9D5, 6C1, và 5A1 cũng phát hiện được dạng tiền tinh bột TTR có mặt trong các vùng của cơ tim mà dương tính miễn dịch với TTR nhưng âm tính với đỏ Congo hoặc Thioflavin T. Cả phần loại bỏ kháng thể sơ cấp và kháng thể đối chứng isotyp IgG đều âm tính với việc nhuộm trên toàn bộ các mô được xét nghiệm. Các kháng thể phản ứng với các protein dạng tinh bột khác (các chuỗi nhẹ lambđa và kapa hoặc dạng tinh bột A) đều không phản ứng với mô tim ATTR được sử dụng trong phân tích này, điều này chỉ ra là các lắng đọng có bản chất TTR đặc trưng.

Các mẫu nhuộm bằng kháng thể TTR-lỗi được so sánh với các mẫu thu được với kháng thể tham chiếu TTR thương mại đã được mô tả rõ ràng (tiền albumin, A0002; Dako; Carpinteria, CA). Kháng thể tham chiếu DAKO nhuộm cơ tim bị bệnh ở các vùng giống như các kháng thể TTR-lỗi, nhưng tạo ra mẫu nhuộm khuếch tán hơn. Kháng thể tham chiếu DAKO không nhuộm các lắng đọng dạng tinh bột TTR ưa congo có mặt trên hệ mạch mạnh như các kháng thể TTR-lỗi.

Các kháng thể TTR-lỗi không nhuộm mô bình thường, không bị bệnh. Ngoài ra, như mong đợi, việc nhuộm bằng kháng thể đối chứng isotyp, 6F10, cũng là âm tính.

Để xác định xem khả năng phản ứng của các kháng thể TTR-lỗi có đặc hiệu với các lắng đọng TTR hay không, khả năng phản ứng chéo của các kháng thể này với mô tim thu được từ các người bệnh được chẩn đoán mắc chứng thoái hóa dạng tinh bột AL sơ cấp được kiểm tra. Như mong đợi, mô chứa dạng tinh bột AL không bắt màu được quan sát thấy, xác nhận là các kháng thể TTR phản ứng đặc hiệu với mô bị bệnh ATTR.

Mô tim từ các người bệnh có chẩn đoán xác nhận mắc bệnh thoái hóa dạng tinh bột toàn thân do tuổi già hoặc từ các người bệnh đã được xác nhận mắc bệnh FAC, hoặc FAP gây ra bởi các đột biến điểm trong gen TTR cũng nhuộm dương tính với 14G8, 9D5, 6C1, và 5A1. Các kết quả này chỉ ra là các kháng thể TTR-lỗi có khả năng nhận biết các lắng đọng TTR trong mô tim bất kể kiểu gen ATTR.

Các mô không phải tim khác đã được biết là biểu hiện TTR cũng được kiểm tra về sự nhuộm bằng các kháng thể TTR-lỗi và được so sánh với việc nhuộm đạt được bằng cách sử dụng kháng thể tham chiếu DAKO. Như mong đợi, gan, tụy và dây đám rối màng mạch đều nhuộm dương tính với TTR bằng cách sử dụng kháng thể tham chiếu Dako. Ngược lại, 14G8 chỉ nhuộm tế bào alpha tụy nằm trong đảo Langerhans và dây đám rối màng mạch,

điều này gợi ý là một số TTR được phân bố trong các cơ quan này khác biệt về cấu hình với TTR biểu hiện trong gan. Sự thiếu khả năng phản ứng miễn dịch mAb TTR-lõi trong gan gợi ý là lượng lớn TTR được biểu hiện ở đó chủ yếu là TTR tetrame, tự nhiên và không có eptitop TTR-lõi được bộc lộ. Các kết quả tương tự thu được khi các mô giống nhau được nhuộm với 9D5, 6C1, và 5A1.

Ví dụ 6. Phân tích ATTR với Huyết tương người bình thường bằng SDS-PAGE/Thẩm tách Western và bằng Thử nghiệm đĩa Meso Scale Discovery (MSD)

Sáu mẫu huyết tương từ người bệnh được xác nhận với V30M ATTR (Mẫu #21, #22, #23, #24, #25, #27) và 6 mẫu từ các đối tượng bình thường (#11, #12, #15, #18, #19, #20) được thu gom từ M. Saraiva (Đại học Porto, Bồ Đào Nha). Mẫu #C6 là mẫu huyết thanh người bình thường thu được từ nguồn thương mại (BioreclamationIVT). Các mẫu được phân tích bằng SDS-PAGE và Thẩm tách Western, hoặc bằng Thử nghiệm đĩa MesoScale Discovery (MSD). Các quy trình cho các thử nghiệm này được mô tả ở đoạn khác trong phần Nguyên liệu và phương pháp (p-r). Đường cong chuẩn được tạo ra cho thử nghiệm đĩa MSD bằng cách sử dụng 6C1.

Trong các mẫu Thẩm tách Western thu được bằng cách sử dụng mAb TTR-lõi 9D5 và 5A1, các khác biệt về kiểu tạo dải giữa mẫu huyết tương bình thường và mẫu huyết tương bị bệnh TTR-V30M có thể được phát hiện. Tất cả các mẫu huyết tương đều chứa dải TTR ~14 kDa mà di chuyển cùng với monome TTR không tự nhiên có mặt trong mẫu tham chiếu pH4-TTR. Nói chung, các mẫu huyết tương thu được từ các người bệnh TTR-V30M (#21, 22, 23, 24, 25, & 27) có nhiều dạng TTR-lõi monome hơn. Ngoài ra, các mẫu huyết tương thu được từ người bệnh V30M cũng chứa dải ~30kDa mà di chuyển cùng với đime TTR không tự nhiên có mặt trong mẫu tham chiếu pH4-TTR. Ngoại trừ các mẫu #12 và #18, các mẫu huyết tương thu được từ các cá thể bình thường chứa ít dạng đime này hơn.

Các mẫu thẩm tách Western trên đây được quét và cường độ của các dải monome và đime TTR phản ứng 9D5 hoặc 5A1 kết hợp được vẽ đồ thị cho mỗi mẫu. Các kết quả này được thể hiện trong Fig.5A (9D5) và Fig.5B (5A1) và được biểu diễn bằng đơn vị nhiệm ý (a.u.) trên trục y. Ngoại trừ mẫu huyết tương #15 và #18, các mẫu huyết tương thu được từ các cá thể bình thường (11, 12, 19, và 20) chứa ít dạng monome và đime phản ứng với 9D5 và 5A1 hơn so với các mẫu thu được từ người bệnh V30M (21-25 và 27).

12 mẫu huyết thanh được phân tích bằng kỹ thuật thẩm tách Western 9D5 và 5A1 cũng được phân tích bằng thử nghiệm đĩa MSD bằng cách sử dụng 6C1 làm kháng thể bắt TTR-lỗi và kháng thể Dako-nhãn sulfo làm kháng thể phát hiện. Các kết quả của các thử nghiệm MSD này được thể hiện trong Fig.6 và được biểu diễn bằng đơn vị nhiệm ý (a.u.) trên trục y. Các mẫu 11, 12, 15, 18, 19, và 20 thể hiện huyết tương bình thường. Các mẫu 21-25 và 27 thể hiện huyết tương mắc bệnh V30M.

Ngoại trừ mẫu huyết tương #15 và #18, lượng TTR phản ứng với 6C1 có mặt trong mẫu huyết tương thu được từ các cá thể bình thường là thấp hơn so với quan sát được trong huyết tương của các cá thể mắc bệnh TTR-V30M. Mức độ phản ứng với 6C1 được đo bằng thử nghiệm MSD tương quan chặt chẽ với lượng monome và đime phản ứng với 9D5 được quan sát thấy trên đây bởi SDS-PAGE/Thẩm tách Western.

Để xác định nồng độ của các dạng TTR phản ứng có mặt trong mẫu huyết tương, các mẫu giống như vậy được thử nghiệm lại bằng cách sử dụng 6C1 làm kháng thể bắt giữ và 8C3-nhãn sulfo làm kháng thể phát hiện. Các tín hiệu MSD được chuyển thành các nồng độ ng/mL của các dạng TTR phản ứng bằng cách sử dụng đường cong chuẩn TTR F87M/L110M đã tạo ra trên đây. Dựa vào phân tích này, nồng độ trung bình của TTR phản ứng với 6C1 có mặt trong các mẫu đối chứng này là 271 +/- 185 ng/ml. Ngược lại, nồng độ trung bình của TTR phản ứng có mặt trong mẫu huyết tương bị bệnh V30M là cao hơn, ở 331 +/- 95 ng/ml. Nói chung, các kết quả MSD này gợi ý là các kháng thể TTR-lỗi có khả năng phân biệt giữa huyết tương mắc bệnh ATTR với huyết tương bình thường. Điều này cho phép phát triển thêm các kháng thể TTR-lỗi để sử dụng trong các thử nghiệm chẩn đoán bệnh ATTR.

Ví dụ 7. Thiết kế các kháng thể 9D5 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu hoặc kháng thể cho để làm tương thích với người là kháng thể chuột 9D5. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của m9D5 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO: 1. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của m9D5 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO: 16. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nặng được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO: 13-15 (như được xác định bởi Kabat). Thể liên hợp CDR-H1 Chothia-Kabat được đề xuất là SEQ ID NO: 117. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nhẹ được đề xuất lần lượt là SEQ ID NO: 24-26 (như được xác định bởi Kabat). Cách đánh số Kabat được sử dụng trong toàn bộ ví dụ này.

Kapa biến đổi (Vk) của m9D5 thuộc phân nhóm Kabat chuột 2, mà tương ứng với phân nhóm Kabat người 3. Chuỗi nặng biến đổi (Vh) của m9D5 thuộc phân nhóm Kabat chuột 3d, mà tương ứng với phân nhóm Kabat 3. Xem Kabat và đồng tác giả Sequences of Proteins of Immunological Interest, xuất bản lần thứ năm. Công bố NIH số 91-3242, 1991. CDR-L1 16 gốc thuộc lớp chính tắc 4, CDR-L2 7 gốc thuộc lớp chính tắc 1, và CDR-L3 9 gốc thuộc lớp chính tắc 1 trong Vk. Xem Martin & Thornton, J. Mol. Biol. 263:800-15, 1996. Thể liên hợp CDR-H1 Chothia-Kabat 10 gốc thuộc lớp chính tắc 1, và CDR-H2 17 gốc thuộc lớp chính tắc 1. Xem Martin & Thornton, J Mol. Biol. 263:800-15, 1996. CDR-H3 không có các lớp chính tắc.

Các gốc ở mặt phân cách giữa các vùng Vk và Vh là các gốc thường được tìm thấy, ngoại trừ Leu ở vị trí 47 trong chuỗi nặng, trong khi Tyr thường ở vị trí này. Vị trí này là ứng viên cho đột biến ngược.

Việc điều tra được thực hiện trên các trình tự protein trong cơ sở dữ liệu PDB (Deshpande và đồng tác giả, Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005) để tìm ra các cấu trúc tạo ra mô hình cấu trúc thô của 9D5. Cấu trúc tinh thể của fab kháng thể (mã pdb là 1MJU) (Ruzheinikov và đồng tác giả, J. Mol. Biol. 332(2):423-435, 2003) được sử dụng cho cấu trúc Vk vì nó có sự phân giải tốt (1,22 A) và có sự tương đồng trình tự chung với 9D5 Vk, giữ được cấu trúc chính tắc giống như 9D5 cho vòng này. Kháng thể monome có mã pdb là 1SEQ (Covaceuszach và đồng tác giả, Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr. 57 (PT 9), 1307-1309, 2001) được sử dụng cho cấu trúc Vh vì nó có sự tương đồng trình tự và sự phân giải tốt (2,0 A), và nó có các cấu trúc chính tắc cho CDR-H1 và CDR-H2 giống như cấu trúc chính tắc của 9D5 VH. Các tác giả sáng chế tạo mô hình chuỗi 9D5 Vh bằng cách cũng sử dụng cấu trúc 1MQK, vì nó có sự phân giải tốt hơn là 1,28 A (Ostermeier và đồng tác giả, Proteins 21(1):74-77, 1995). Phần mềm BioLuminate (được cấp lixăng từ Schrodinger Inc.) được sử dụng để tạo mô hình cấu trúc thô của 9D5.

Việc điều tra cơ sở dữ liệu trình tự protein không dư thừa từ NCBI cho phép lựa chọn các khung người thích hợp để ghép các CDR chuột vào đó. Đối với Vh, chuỗi nặng Ig người BAC02114 (GI: 21670209) (SEQ ID NO: 3) được lựa chọn (Akahori và đồng tác giả, Construction and characterization of antibody libraries: isolation of therapeutic human antibodies and application to functional genomics, Direct Submission, 25 tháng 7, 2001). Nó có chung các dạng chính tắc với 9D5. Nó là thành viên của phân nhóm nặng Kabat của

người 1. 9D5 Vh có một số gốc khung độc nhất và trình tự nhận khung người bất kỳ không thể hiện tính tương đồng rất cao. Do đó, chúng tôi cũng sử dụng Khung thứ hai, AAX82494 (GI: 62421461) (SEQ ID NO: 4) (Lundquist và đồng tác giả, Infect. Immun. 74(6), 3222-3231, 2006) để tạo ra khung nhận lai. Đối với Vk, chuỗi nhẹ kapa người có mã truy cập NCBI là ABC66952 (GI: 84798006) (Shriner và đồng tác giả, Vaccine 24(49-50):7159-7166, 2006) được lựa chọn (SEQ ID NO: 18). Nó có các nhóm chính tắc cho CDR-L1 và L2 giống như các nhóm chính tắc cho Vk mẹ. Nó là một thành viên của phân nhóm kapa Kabat người 2.

Tám biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và năm biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa các hoán vị khác nhau của các đột biến thế (Hu9D5VHv1, 2, 2b, 3, 3b, 4, 4b, và 5 (SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12, tương ứng) và Hu9D5VLv1-5 (SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23, tương ứng)) (Bảng 7 và 8). Các thiết kế Vh và Vk được làm tương thích với người điển hình, có các đột biến ngược và các đột biến khác dựa trên khung người đã chọn, được thể hiện lần lượt trong bảng 7 và 8. Các vùng được tô màu xám trong cột thứ nhất trong bảng 7 và 8 thể hiện các CDR như được xác định bởi Chothia, và các vùng được tô màu xám trong các cột còn lại trong bảng 7 và 8 thể hiện các CDR như được xác định bởi Kabat. SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12 và 19-23 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong bảng 9. Các axit amin ở các vị trí H42, H47, H69, H82, H82(b), H108, L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70, và L74 trong Hu9D5VHv1, 2, 2b, 3, 3b, 4, 4b, và 5 và Hu9D5VLv1-5 được liệt kê trong bảng 10 và 11.

Bảng 7

Vùng 9D5 Vh được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	9D5 VH chuột (SEQ ID NO: 1)	Fr nhận VH Hu Acc#BAC02114 (SEQ ID NO: 3)	Fr nhận VH Hu Acc#AAX82494 (SEQ ID NO: 4)	Hu9D5 VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Hu9D5 VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Hu9D5 VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Hu9D5 VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Hu9D5 VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Hu9D5 VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Hu9D5 VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Hu9D5 VHv5 (SEQ ID NO: 12)
1	1	1	Fr1	E	E	Q	E	E	E	E	E	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	K	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	Q	V	V	V	V	V	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	K	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	R	K	R	R	K	R	K	R	K	R
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L

49742

21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR -H1	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
27	27	27	CDR -H1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
28	28	28	CDR -H1	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
29	29	29	CDR -H1	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
30	30	30	CDR -H1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR -H1	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
32	32	32	CDR -H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR -H1	T	E	G	T	T	T	T	T	T	T	T
34	34	34	CDR -H1	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M	M
35	35	35	CDR -H1	S	N	S	S	S	S	S	S	S	S	S
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	40	Fr2	T	A	T	A	A	T	A	T	A	A	T

41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	G	D	G	G	E	G	G	G	G	E
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	G	R	G	G	R	G	R	G	R	R
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	L	W	W	L	L	L	W	L	W	L	L
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	S	A	A	A	A	S	A	S	A	A
50	50	50	CDR -H2	E	Y	T	E	E	E	E	E	E	E	E
51	51	51	CDR -H2	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR -H2	S	T	S	S	S	S	S	S	S	S	S
52A	52A	53	CDR -H2	N	S	S	N	N	N	N	N	N	N	N
53	53	54	CDR -H2	S	S	G	S	S	S	S	S	S	S	S
54	54	55	CDR -H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR -H2	D	S	S	D	D	D	D	D	D	D	D
56	56	57	CDR -H2	T	T	Y	T	T	T	T	T	T	T	T
57	57	58	CDR -H2	T	I	T	T	T	T	T	T	T	T	T
58	58	59	CDR -H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

49742

59	59	60	CDR -H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	60	61	CDR -H2	P	A	P	P	P	P	P	P	P	P	P
61	61	62	CDR -H2	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR -H2	T	S	S	T	T	T	T	T	T	T	T
63	63	64	CDR -H2	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
64	64	65	CDR -H2	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR -H2	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F	F
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	F	I	I	F	F	I	F	I	I	I	I
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
74	74	75	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K	K
76	76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N	N
77	77	78	Fr3	T	S	T	S	S	T	S	T	S	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q

49742

82	82	83	Fr3	M	M	M	S	S	M	S	M	S	M	M
82A	82A	84	Fr3	S	N	S	N	N	S	N	S	N	S	N
82B	82B	85	Fr3	S	S	S	S	L	S	L	S	L	S	L
82C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	K	K	R	K	R	K	R	K	R
84	84	88	Fr3	S	A	S	A	A	S	A	S	A	S	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	M	V	V	M	V	M	V	M	V
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C	C
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R	R
95	95	99	CDR -H3	H	G	L	H	H	H	H	H	H	H	H
96	96	100	CDR -H3	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
97	97	101	CDR -H3	Y	Q	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
98	98	102	CDR -H3	Y	G	G	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
99	99	103	CDR -H3	G	S	Y	G	G	G	G	G	G	G	G
100	100	104	CDR -H3	G	R	R	G	G	G	G	G	G	G	G
100A	100A	105	CDR -H3	G	Y	Y	G	G	G	G	G	G	G	G

49742

100B	100B	106	CDR-H3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
100C	100C	107	CDR-H3	G	Y	F	G	G	G	G	G	G	G	G
100D	100D	108	CDR-H3	G	Y	-	G	G	G	G	G	G	G	G
100E	100E	109	CDR-H3	W	Y	-	W	W	W	W	W	W	W	W
100F	100F	110	CDR-H3	F	G	-	F	F	F	F	F	F	F	F
100G	100G	111	CDR-H3	F	M	-	F	F	F	F	F	F	F	F
101	101	112	CDR-H3	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D	D
102	102	113	CDR-H3	V	V	Y	V	V	V	V	V	V	V	V
103	103	114	Fr4	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W	W
104	104	115	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
105	105	116	Fr4	T	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
106	106	117	Fr4	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G	G
107	107	118	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
108	108	119	Fr4	T	T	M	T	T	L	T	L	T	L	T
109	109	120	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
110	110	121	Fr4	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T	T
111	111	122	Fr4	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V	V
112	112	123	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S
113	113	124	Fr4	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S	S

49742

87/204

Bảng 8

Các vùng 9D5 Vk được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	9D5 VL chuột (SEQ ID NO: 16)	Fr nhận VL Hu Acc#ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Hu9D5 VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Hu9D5 VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Hu9D5 VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Hu9D5 VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Hu9D5 VLv5 (SEQ ID NO: 23)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	I	I	I	I	I	I	I
3	3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M	M
5	5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	7	Fr1	A	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	A	P	P	P	P	A	A
9	9	9	Fr1	P	L	L	L	L	P	P
10	10	10	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
11	11	11	Fr1	V	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
13	13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
14	14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
15	15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	E	E	E	E	E	E	E
18	18	18	Fr1	S	P	P	P	P	P	S
19	19	19	Fr1	V	A	A	A	A	V	V
20	20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
21	21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I	I
22	22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S	S

23	23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C	C
24	24	24	CDR -L1	R	R	R	R	R	R	R
25	25	25	CDR -L1	S	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR -L1	S	N	S	S	S	S	S
27	27	27	CDR -L1	K	Q	K	K	K	K	K
27 A	27A	28	CDR -L1	S	S	S	S	S	S	S
27 B	27B	29	CDR -L1	L	L	L	L	L	L	L
27 C	27C	30	CDR -L1	L	L	L	L	L	L	L
27 D	27D	31	CDR -L1	H	Y	H	H	H	H	H
27E	27E	32	CDR -L1	S	S	S	S	S	S	S
28	28	33	CDR -L1	N	N	N	N	N	N	N
29	29	34	CDR -L1	G	G	G	G	G	G	G
30	30	35	CDR -L1	N	Y	N	N	N	N	N
31	31	36	CDR -L1	T	N	T	T	T	T	T
32	32	37	CDR -L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	38	CDR -L1	L	L	L	L	L	L	L

34	34	39	CDR -L1	Y	D	Y	Y	Y	Y	Y
35	35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	F	Y	F	Y	Y	F	F
37	37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	R	K	K	K	K	R	R
40	40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G	G
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
46	46	51	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
47	47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR -L2	R	S	R	R	R	R	R
51	51	56	CDR -L2	V	G	V	V	V	V	V
52	52	57	CDR -L2	S	S	S	S	S	S	S
53	53	58	CDR -L2	N	N	N	N	N	N	N
54	54	59	CDR -L2	L	R	L	L	L	L	L
55	55	60	CDR -L2	A	A	A	A	A	A	A
56	56	61	CDR -L2	S	S	S	S	S	S	S

57	57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P	P
60	60	65	Fr3	D	D	D	D	S	S	S
61	61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
65	65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
66	66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	A	D	D	D	D	A	A
71	71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T	T
73	73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L	L
74	74	79	Fr3	R	K	K	K	K	R	R
75	75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
84	84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G	G
85	85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y

88	88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C	C
89	89	94	CDR -L3	M	M	M	M	M	M	M
90	90	95	CDR -L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR -L3	H	A	H	H	H	H	H
92	92	97	CDR -L3	L	L	L	L	L	L	L
93	93	98	CDR -L3	E	Q	E	E	E	E	E
94	94	99	CDR -L3	Y	S	Y	Y	Y	Y	Y
95	95	100	CDR -L3	P	P	P	P	P	P	P
96	96	101	CDR -L3	L	Y	L	L	L	L	L
97	97	102	CDR -L3	T	T	T	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
100	100	105	Fr4	A	Q	Q	Q	Q	Q	Q
101	101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L	L
105	105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I	I	I	I
107	107	112	Fr4	K	K	K	K	K	K	K

Bảng 9

Các đột biến ngược V_H, V_L và các đột biến khác

Biến thể V_H hoặc V_L	Trình tự nhận exon V_H hoặc V_L	Các gốc khung cho
Hu9D5VHv1 (SEQ ID NO: 5)	Mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494 (SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng)	H47, H69, H82
Hu9D5VHv2 (SEQ ID NO: 6)	Mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494 (SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng)	H47, H69, H82, H82b
Hu9D5VHv2b (SEQ ID NO: 7)	Mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494 (SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng)	H42, H47, H108
Hu9D5VHv3 (SEQ ID NO: 8)	Mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494 (SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng)	H69, H82, H82b
Hu9D5VHv3b (SEQ ID NO: 9)	Mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494 (SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng)	H47, H108
Hu9D5VHv4 (SEQ ID NO: 10)	Mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494 (SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng)	H82, H82b
Hu9D5VHv4b (SEQ ID NO: 11)	Mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494 (SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng)	H47, H108
Hu9D5VHv5 (SEQ ID NO: 12)	Mã truy cập NCBI là BAC02114 và AAX82494 (SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng)	H42, H47, H82b
Hu9D5VLv1 (SEQ ID NO: 19)	Mã truy cập NCBI là ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L36
Hu9D5VLv2 (SEQ ID NO: 20)	Mã truy cập NCBI là ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	Không

Hu9D5VLv3 (SEQ ID NO: 21)	Mã truy cập NCBI là ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L60
Hu9D5VLv4 (SEQ ID NO: 22)	Mã truy cập NCBI là ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70, L74
Hu9D5VLv5 (SEQ ID NO: 23)	Mã truy cập NCBI là ABC66952 (SEQ ID NO: 18)	L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70, L74

Bảng 10

Đánh số Kabat các gốc khung

cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong vùng Vh của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người

Gốc	Chuỗi nặng BAC02114	Chuỗi nặng AAX82494	9D5chuột	Hu9D5VHv1	Hu9D5VHv2	Hu9D5VHv2b	Hu9D5VHv3	Hu9D5VHv3b	Hu9D5VHv4	Hu9D5VHv4b	Hu9D5VHv5
H42	G	D	E	G	G	E	G	G	G	G	E
H47	W	W	L	L	L	L	W	L	W	L	L
H69	I	I	F	F	F	I	F	I	I	I	I
H82	M	M	M	S	S	M	S	M	S	M	M
H82b	S	S	S	S	L	S	L	S	L	S	L
H108	T	T	T	T	T	L	T	L	T	L	T

Bảng 11

Đánh số Kabat các gốc khung

cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong các vùng Vk của kháng thể 9D5 được làm tương thích với người

Gốc	Chuỗi nhẹ ABC66952	9D5 chuột	Hu9D5 VLv1	Hu9D5 VLv2	Hu9D5 VLv3	Hu9D5 VLv4	Hu9D5 VLv5
L8	P	A	P	P	P	A	A
L9	L	P	L	L	L	P	P
L18	P	S	P	P	P	P	S
L19	A	V	A	A	A	V	V
L36	Y	F	F	Y	Y	F	F
L39	K	R	K	K	K	R	R
L60	D	D	D	D	S	S	S
L70	D	A	D	D	D	A	A
L74	K	R	K	K	K	R	R

Sự canh thẳng trình tự trình tự 9D5 Vh chuột (SEQ ID NO: 1) với trình tự mẫu chuột (1SEQ_H và 1MQK_H; SEQ ID NO: 2 và 62, tương ứng), các trình tự nhận của người (BAC02114 và AAX82494; SEQ ID NO: 3 và 4, tương ứng), và các trình tự Hu9D5VHv1, Hu9D5VHv2, Hu9D5VHv2b, Hu9D5VHv3, Hu9D5VHv3b, Hu9D5VHv4, Hu9D5VHv4b, và Hu9D5VHv5 (SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12, tương ứng), được thể hiện trong Fig.1A. Các CDR như được xác định bởi Kabat được đóng khung, ngoại trừ khung đầu tiên là thể liên hợp CDR-H1 Chothia và CDR-H1 Kabat, với CDR-H1 Kabat được gạch chân và in đậm. Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc, Vernier, hoặc 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 nền vernier/CDR bao gồm các gốc 2, 49, 69, 71, 75, 80, và 94 theo cách đánh số Kabat trong bảng 7. Ví dụ về các gốc tương tác chính tắc/CDR bao gồm các gốc 24, 48, và 73 theo cách đánh số Kabat trong bảng 7. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/đóng gói bao gồm các gốc 37, 39, 44, 47, 91, 93, và 103 theo cách đánh số Kabat trong bảng 7.

Sự canh thẳng trình tự 9D5 Vk chuột (SEQ ID NO: 16) với trình tự mẫu của chuột (1MJU_L; SEQ ID NO: 17), trình tự nhận của người (ABC66952; SEQ ID NO: 18), và

các trình tự Hu9D5VLv1, Hu9D5VLv2, Hu9D5VLv3, Hu9D5VLv4, và Hu9D5VLv5 (SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23, tương ứng), được thể hiện trong Fig.1B. Các CDR như được xác định bởi Kabat được đóng khung, ngoại trừ khung đầu tiên là thể liên hợp của CDR-H1 Chothia và CDR-H1 Kabat, với CDR-H1 Kabat được gạch chân và in đậm. Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc, vernier hoặc 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 nền vernier/CDR bao gồm các gốc 4, 35, 46, 49, 66, 68, và 69 theo cách đánh số Kabat trong bảng 8. Ví dụ về các gốc tương tác chính tắc/CDR bao gồm các gốc 2, 48, 64, và 71 theo cách đánh số Kabat trong bảng 8. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/đóng gói (VH+VL) bao gồm các gốc 36, 38, 44, 47, 87, và 98 theo cách đánh số Kabat trong bảng 8.

Lý do lựa chọn các vị trí được chỉ ra trong bảng 9 và 11 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ làm ứng viên cho sự thế là như sau.

P8A: Mô hình này thể hiện nút thắt trong vòng ở vị trí này, do đó đột biến ngược thành A được thử để làm giảm điều này.

L9P: Mô hình này thể hiện nút thắt trong vòng ở vị trí này, do đó đột biến ngược thành P được thử để làm giảm điều này.

P18S: P ít khi ở vị trí này. Đột biến thành S được thử để làm giảm sự méo vòng.

A19V: A và V có tần số xuất hiện ở vị trí này tương đương nhau. Đột biến thành V được thử để làm giảm sự méo vòng.

Y36F: Đây là gốc ở mặt phân cách, và thường là Y hoặc F. Y có nhóm hydroxyl bổ sung mà có thể ảnh hưởng tiềm tàng đến sự đóng gói LC + HC. Tính phân cực của Y36 có thể gây cản trở tiềm tàng sự bố trí gốc H95 chuỗi nặng CRD-H3. Mô hình tương đồng thể hiện là Y ở vị trí này sẽ tạo ra liên kết H nữa với F100(g) trong H3 mà có thể dẫn đến sự hạn chế di chuyển của H3. Cả F và Y đều được sử dụng trong các dạng riêng biệt.

K39R: R tạo ra các liên kết H với các gốc nối tiếp trong vòng này so với K. Để loại trừ các tác động bất kỳ trên tính ổn định của vòng, đột biến thành R được thử.

D60S: Sự có mặt của D ở gốc này thể hiện tính chất dễ bị phân giải protein. Ở một số dạng, nó được thay thế bằng S, gốc thường xuyên nhất trong dòng phôi người ở vị trí này. Điều này được dự đoán để làm tăng tính ổn định.

D70A: D có khả năng phân giải protein, do đó đột biến thành A được thử.

K74R: R có thể làm ổn định vòng so với K ở vị trí này, do đó đột biến thành R được thử.

Lý do để chọn các vị trí được chỉ ra trong bảng 9 và 10 trong vùng biến đổi chuỗi nặng làm ứng viên cho sự thế là như sau.

G42E: E tạo ra các tương tác ion hóa với R ở vị trí 44. Để loại bỏ tác động bất kỳ mà các tương tác này có thể gây ra, đột biến ngược thành E được kiểm tra trong một số dạng.

W47L: Đây là gốc trên mặt phân cách, thường là W. Ở chuỗi nặng 9D5 của chuột, nó là L, trong khi trong khung nhận của người, W ở vị trí này. Mặc dù L và W đều là không phân cực, vòng phenol trong W có thể gây tác động tiềm tàng lên sự đóng gói chuỗi nhẹ: chuỗi nặng. W và L đều được đưa vào trong các dạng riêng biệt.

I69F: Đây là gốc vernier, một phần của nền CDR-H2. Theo mô hình tương đồng này, vòng thơm của F trong các trình tự chuột tạo thành chồng bánh với vòng thơm của gốc CRD-H2 Y59. Gốc I ở vị trí này làm xáo trộn sự xếp chồng này. I và F được đưa vào trong các dạng riêng biệt.

M82S: M ở vị trí này là rất hiếm trong khung người. Phổ biến hơn là A hoặc N. Việc thay thế gốc này thành S phổ biến hơn có thể làm giảm khả năng gây miễn dịch mà có thể liên quan đến việc M hiếm ở vị trí này. Dựa vào các quan sát mô hình, có khả năng là M tương tác với Leu80, mà là gốc vùng vernier. M và S được đưa vào trong các dạng riêng biệt.

S82(b)L: S có mặt ở vị trí này trong các trình tự khung của cả chuột và người, nhưng S ở vị trí này ít thường xuyên hơn. Đánh giá từ vị trí mà gốc này nằm trong mô hình này, nó có thể tiếp xúc với kháng nguyên. Các gốc trong vùng khung 3 của chuỗi nặng được biết là hiếm khi góp phần vào việc liên kết. S và L được bao gồm trong các dạng riêng biệt.

T108L: L là gốc ở vị trí này thường xuyên nhất trong khung người, do đó L được thử trong một số dạng.

Vì hai khung nhận của người (BAC02114 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 3 và 4)) được sử dụng để làm tương thích với người vùng biến đổi chuỗi nặng 9D5, có một số vị trí khung mà có các axit amin khác nhau trong trong hai khung nhận này. Các dạng được làm tương thích với người của vùng biến đổi chuỗi nặng 9D5 có thể bao gồm mỗi axit amin ở

các gốc này. Ví dụ về các gốc mà tại đó hai khung nhận này khác nhau bao gồm các vị trí H19 (R hoặc K), H40 (A hoặc T), H44 (G hoặc R), H49 (S hoặc A), H77 (S hoặc T), H82a (N hoặc S), H83 (R hoặc K), H84 (A hoặc S), và H89 (V hoặc M) theo cách đánh số Kabat. Lý do để chọn một axit amin hay axit amin còn lại ở các vị trí này là như sau.

H19 (R hoặc K): R và K có mặt trong hai khung được xem xét, do đó mỗi gốc được thử trong các dạng riêng biệt.

H40 (A hoặc T): A và T có mặt trong hai khung được xem xét, do đó mỗi gốc được thử trong các dạng riêng biệt.

H44 (G hoặc R): G và R có mặt trong hai khung được xem xét, do đó mỗi gốc được thử trong các dạng riêng biệt.

H49 (S hoặc A): Đây là gốc vernier mà đóng gói dưới CDR-H2. Trong trình tự chuột này, nó là A. Sự khác biệt nhỏ về kích thước và tính chất ưa nước của S có thể làm xáo trộn nền CDR. S và A được bao gồm trong các dạng riêng biệt.

H77 (S hoặc T): S và T có mặt trong hai khung nhận của người được xem xét, do đó mỗi gốc này được thử trong các dạng riêng biệt.

H82a (N hoặc S): N ở vị trí này ít thường xuyên hơn nhiều so với S. Ngoài ra, S có thể góp phần vào sự liên kết kháng nguyên. Đột biến thành S được thử trong một số dạng.

H83 (R hoặc K): K trong vùng khung 3 là gần với vùng bề mặt liên kết CDR. Việc thay thế nó bằng R, cồng kềnh hơn so với K, có thể che khuất vị trí của kháng nguyên. R là thường xuyên nhất và K là thường xuyên thứ ba trong khung người ở vị trí này. R và K được bao gồm trong các dạng riêng biệt.

H84 (A hoặc S): S và A có mặt trong hai khung được xem xét, do đó mỗi gốc được thử trong các dạng riêng biệt.

H89 (V hoặc M): V và M có mặt trong hai khung được xem xét, do đó mỗi gốc được thử trong các dạng riêng biệt.

Năm biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người và năm biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người là như sau:

Hu9D5VL kiểu 1 (đột biến thế Y36F thể hiện bằng chữ thường):

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVS NLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 19)

Hu9D5VL kiểu 2 (không có đột biến thế):

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYRV SNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEI K (SEQ ID NO: 20)

Hu9D5VL kiểu 3 (đột biến thế D60S thể hiện bằng chữ thường):

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGNTYLYWYLQKPGQSPQLLIYRV SNLASGVPsRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEI K (SEQ ID NO: 21)

Hu9D5VL kiểu 4 (đột biến thế P8A, L9P, A19V, Y36F, K39R, D60S, D70A, và K74R thể hiện bằng chữ thường):

DIVMTQSapSLPVTPGEPvSISCRSSKSLLHSNGNTYLYWfLQrPGQSPQLLIYRVSN LASGVPsRFSGSGSGTaFTLrISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 22)

Hu9D5VL kiểu 5 (đột biến thế P8A, L9P, P18S, A19V, Y36F, K39R, D60S, D70A, và K74R thể hiện bằng chữ thường):

DIVMTQSapSLPVTPGEsvSISCRSSKSLLHSNGNTYLYWfLQrPGQSPQLLIYRVSN LASGVPsRFSGSGSGTaFTLrISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK (SEQ ID NO: 23)

Hu9D5VH kiểu 1 (đột biến thế W47L, I69r, và M82S thể hiện bằng chữ thường):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLElVAEISNSG DTTYYPDTVKGRFTfSRDNAKNSLYLQsNSLKAEDTAVYYCARHYYYGGGYGG WFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 5)

Hu9D5VH kiểu 2 (đột biến thế W47L, I69F, M82S, và S82(b)L thể hiện bằng chữ thường):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEIVAEISNSG
DTTYYPDTVKGRFTfSRDNAKNSLYLQsNlLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGG
WFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 6)

Hu9D5VH kiểu 2b (đột biến thế G42E, W47L, và T108L thể hiện bằng chữ thường):

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPeKRLEIVAEISNSG
DTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGG
WFFDVWGQGTlVTVSS (SEQ ID NO: 7)

Hu9D5VH kiểu 3 (đột biến thế I69F, M82S, và S82(b)L thể hiện bằng chữ thường):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISNS
GDTTYYPDTVKGRFTfSRDNAKNSLYLQsNlLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGG
WFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 8)

Hu9D5VH kiểu 3b (đột biến thế W47L và T108L thể hiện bằng chữ thường):

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPGKRLEIVAEISNSG
DTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGG
WFFDVWGQGTlVTVSS (SEQ ID NO: 9)

Hu9D5VH kiểu 4 (đột biến thế M82S và S82(b)L thể hiện bằng chữ thường):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKGLEWVSEISNS
GDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQsNlLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGG
WFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 10)

Hu9D5VH kiểu 4b (đột biến thế W47L và T108L thể hiện bằng chữ thường):

EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPGKRLEIVAEISNSG
DTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGG
WFFDVWGQGTlVTVSS (SEQ ID NO: 11)

Hu9D5VH kiểu 5 (đột biến thế G42E, W47L, và S82(b)L thể hiện bằng chữ thường):

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPeKRLElVAEISNSG
DTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNlLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGG
WFFDVWGQGTTVTVSS (SEQ ID NO: 12)

Phân tích chất lượng protein cùng với các phân tích khả năng kết tụ chỉ ra không có cụm gốc nào có xu hướng kết tụ rõ ràng có mặt trong các vùng khung chuỗi nhẹ và chuỗi nặng 9D5 hoặc các CDR (Wang và đồng tác giả, mAbs 1(3):254-267, 2009).

Ví dụ 8. Phân tích động học liên kết các kháng thể 9D5 được làm tương thích với người

Động học liên kết của sự liên kết của tất cả các biến thể 9D5 được làm tương thích với người, 9D5 chuột, và 9D5 khảm với TTR F87M/L110M người tái tổ hợp được mô tả bằng Biacore, như được thể hiện trong bảng 12. Kháng thể kháng người (GE Healthcare) được bất động trên chip cảm biến C5 (thiếu chuỗi dextran) bằng cách tạo cặp amin theo các hướng dẫn được cung cấp trong kit kháng người GE Healthcare, và các mAb được bắt giữ đến mức độ đảm bảo sự liên kết tối đa của chất phân tích là 30-50 RU. Nhiều nồng độ khác nhau của chất phân tích (TTR F87M/L110M người tái tổ hợp) được cho qua phối tử đã bị bắt giữ ở tốc độ 50 ul/phút trong đệm chạy (HBS + 0,05% P-20, 1 mg/mL BSA) trong các dung dịch pha loãng 3 lần. Với mỗi nồng độ, phản ứng xảy ra trong khung thời gian cho phép các nồng độ chất phân tích cao hơn đạt tới trạng thái cân bằng khi liên hợp, cũng như ít nhất là 10% tín hiệu giảm trong quá trình phân ly. Ít nhất là một nồng độ (không phải cao nhất hoặc thấp nhất) được chạy hai lần. Các khoảng nồng độ chất phân tích được chọn dựa vào thử nghiệm sơ bộ để bao trùm ít nhất là 10 lần trên K_D đến 10 lần dưới K_D.

Bảng 12 tổng kết tốc độ liên hợp Biacore (k_a), tốc độ phân ly (k_d), và hằng số ái lực liên kết (K_D) của các biến thể 9D5 chuột, khảm và được làm tương thích với người đối với TTR F87M/L110M người tái tổ hợp.

Bảng 12

Ái lực liên kết kháng nguyên của kháng thể 9D5 với TTR người (F87M/L110M)

Kháng thể	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Rmax
9D5 chuột	2,72E+04	4,93E-04	1,82E-08	31,55
9D5 khảm	2,59E+05	3,50E-04	1,35E-09	47,05
Hu9D5 H2L5	1,15E+05	7,85E-04	6,84E-09	57,6
Hu9D5 H3L1	1,52E+04	6,57E-04	4,32E-09	54,93
Hu9D5 H4bL1	2,54E+05	5,33E-04	2,09E-09	43,91

Các kết quả này chỉ ra rằng ái lực của 9D5 chuột với TTR-F87M/L110M (K_D = 1,82E-08M) được cải thiện nhẹ trong biến thể 9D5 khảm (K_D = 1,35E-09M). Ngoài ra, các biến thể 9D5 được làm tương thích với người hoàn toàn đều có ái lực tương tự trong khoảng nM thấp. Hu9D5 H4bL1 có ái lực mạnh nhất (K_D = 2,09E-09) trong số các biến thể 9D5 được làm tương thích với người được thử nghiệm.

Ví dụ 9. Thiết kế các kháng thể 14G8 được làm tương thích với người

Điểm khởi đầu hoặc kháng thể cho để làm tương thích với người là kháng thể chuột 14G8. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nặng của m14G8 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO: 61. Trình tự axit amin biến đổi chuỗi nhẹ của m14G8 trưởng thành được đề xuất là SEQ ID NO: 70. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nặng được đề xuất là SEQ ID NO: 67-69, tương ứng (như được xác định bởi Kabat). Thể liên hợp CDR-H1 Chothia-Kabat được đề xuất là SEQ ID NO: 118. Trình tự axit amin CDR1, CDR2, và CDR3 chuỗi nhẹ được đề xuất là SEQ ID NO: 77-79, tương ứng (như được xác định bởi Kabat). Dạng biến đổi của CDR1 được đề xuất là SEQ ID NO: 80. Cách đánh số Kabat được sử dụng trong toàn bộ ví dụ này.

Kapa biến đổi (Vk) của m14G8 thuộc phân nhóm Kabat chuột 2, tương ứng với phân nhóm Kabat người 2. Chuỗi nặng biến đổi (Vh) của m14G8 thuộc phân nhóm Kabat chuột 3d, tương ứng với phân nhóm Kabat 1. Xem Kabat và đồng tác giả Sequences of Proteins of Immunological Interest, xuất bản lần thứ năm. Công bố NIH số 91-3242, 1991. CDR-L1 16 gốc thuộc lớp chính tắc 3, CDR-L2 7 gốc thuộc lớp chính tắc 1, và CDR-L3 9 gốc thuộc lớp chính tắc 1 trong Vk. Xem Martin & Thornton, J. Mol. Biol. 263:800-15,

1996. Thể liên hợp CDR-H1 Chothia-Kabat 10 gốc thuộc lớp chính tắc 1, và CDR-H2 17 gốc thuộc lớp chính tắc 1. Xem Martin & Thornton, J Mol. Biol. 263:800-15, 1996. CDR-H3 không có lớp chính tắc, nhưng vòng 15 gốc này có thể có đáy bị thắt nút theo các quy tắc của Shirai và đồng tác giả, FEBS Lett. 455:188-97 (1999).

Các gốc ở mặt phân cách giữa các vùng Vk và Vh là các gốc được tìm thấy phổ biến ngoại trừ L47, ở vị trí này axit amin chủ yếu thường là W.

Việc điều tra được thực hiện trên các trình tự protein trong cơ sở dữ liệu PDB (Deshpande và đồng tác giả, Nucleic Acids Res. 33: D233-7, 2005) để phát hiện các cấu trúc sẽ tạo ra mô hình cấu trúc thô của 14G8. Cấu trúc tinh thể của Fab có hoạt tính esteraza (pdb 1MJU) được sử dụng làm mô hình cho cấu trúc Vk. Nó được hòa tan ở sự phân giải là 1,22 A và chứa các cấu trúc chính tắc giống nhau cho CDR-H1 và CDR-H2, và cũng chứa CDR-H3 có cùng độ dài với đáy bị thắt nút. Đoạn Fv kháng thể 7E2 kháng cytocrom C oxidaza (mã pdb là 1MQK_H) được sử dụng cho cấu trúc Vh. Nó có sự phân giải là 1,28 A và giữ được cấu trúc chính tắc cho các vòng này giống như 14G8. Phần mềm BioLuminate (được lixăng từ Schrodinger Inc.) được sử dụng để tạo mô hình cấu trúc thô của 14G8.

Việc điều tra cơ sở dữ liệu trình tự protein không dư thừa từ NCBI cho phép lựa chọn các khung người thích hợp để ghép các CDR chuột vào đó. Đối với Vh, chuỗi nặng Ig người có mã truy cập NCBI là AAD30410.1 và AAX82494.1 được lựa chọn. Các chuỗi này có chung dạng chính tắc với 14G8 CDR-H1 và H2, và H3 của AAD30410.1 dài 15 gốc với đáy được dự đoán bị thắt nút. Đối với Vk, hai chuỗi nhẹ kapa của người có mã truy cập NCBI là ABA71374.1 và ABC66952.1 được lựa chọn. Chúng có cùng lớp chính tắc với các LCDR.

Ba biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người và ba biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tạo ra chứa các hoán vị khác nhau của các đột biến thế (Hu14G8VHv1-3 (SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66, tương ứng) và Hu14G8VLv1-3 (SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76, tương ứng)) (Bảng 13 và 14). Các thiết kế Vh và Vk được làm tương thích với người điển hình, có các đột biến ngược và các đột biến khác dựa trên các khung người đã chọn, được thể hiện trong các Bảng 13 và 14, tương ứng. Các vùng được tô màu xám trong cột thứ nhất trong bảng 13 và 14 thể hiện các CDR như được xác định bởi Chothia, và các vùng được tô màu xám

trong các cột còn lại trong bảng 13 và 14 thể hiện các CDR như được xác định bởi Kabat. SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66 và 74-76 chứa các đột biến ngược và các đột biến khác như được thể hiện trong bảng 15. Các axit amin ở các vị trí H1, H3, H47, H105, L8, L9, L19, L26, L36, L60, và L70 trong Hu14G8VHv1-3 và Hu14G8VLv1-3 được liệt kê trong bảng 16 và 17.

Bảng 13

Các vùng Vh 14G8 được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	14G8 VH chuột (SEQ ID NO: 61)	Fr nhận Hu VH Acc# AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Fr nhận Hu VH Acc# AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
1	1	1	Fr1	E	Q	Q	E	E	E
2	2	2	Fr1	V	V	V	V	V	V
3	3	3	Fr1	K	Q	Q	K	Q	Q
4	4	4	Fr1	L	L	L	L	L	L
5	5	5	Fr1	V	V	Q	V	V	V
6	6	6	Fr1	E	Q	E	E	E	E
7	7	7	Fr1	S	S	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	G	G	G	G	G	G
9	9	9	Fr1	G	G	G	G	G	G
10	10	10	Fr1	G	G	G	G	G	G
11	11	11	Fr1	L	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	V	V	V	V	V	V
13	13	13	Fr1	Q	Q	K	Q	Q	Q
14	14	14	Fr1	P	P	P	P	P	P
15	15	15	Fr1	G	G	G	G	G	G
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	S	S	S	S	S	S
18	18	18	Fr1	L	R	L	L	L	L
19	19	19	Fr1	K	K	K	K	K	K
20	20	20	Fr1	L	L	L	L	L	L
21	21	21	Fr1	S	S	S	S	S	S
22	22	22	Fr1	C	C	C	C	C	C
23	23	23	Fr1	A	A	A	A	A	A
24	24	24	Fr1	A	A	A	A	A	A
25	25	25	Fr1	S	S	S	S	S	S
26	26	26	Fr1	G	G	G	G	G	G
27	27	27	Fr1	F	F	F	F	F	F
28	28	28	Fr1	T	T	T	T	T	T
29	29	29	Fr1	F	F	F	F	F	F
30	30	30	Fr1	S	S	S	S	S	S
31	31	31	CDR-H1	S	S	S	S	S	S
32	32	32	CDR-H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
33	33	33	CDR-H1	T	A	G	T	T	T
34	34	34	CDR-H1	M	M	M	M	M	M
35	35	35	CDR-H1	S	S	S	S	S	S

Bảng 13

Các vùng Vh 14G8 được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	14G8 VH chuột (SEQ ID NO: 61)	Fr nhận Hu VH Acc# AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Fr nhận Hu VH Acc# AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
36	36	36	Fr2	W	W	W	W	W	W
37	37	37	Fr2	V	V	V	V	V	V
38	38	38	Fr2	R	R	R	R	R	R
39	39	39	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
40	40	40	Fr2	T	T	T	T	T	T
41	41	41	Fr2	P	P	P	P	P	P
42	42	42	Fr2	E	E	D	E	E	E
43	43	43	Fr2	K	K	K	K	K	K
44	44	44	Fr2	R	R	R	R	R	R
45	45	45	Fr2	L	L	L	L	L	L
46	46	46	Fr2	E	E	E	E	E	E
47	47	47	Fr2	L	W	W	L	L	L
48	48	48	Fr2	V	V	V	V	V	V
49	49	49	Fr2	A	A	A	A	A	A
50	50	50	CDR-H2	E	A	T	E	E	E
51	51	51	CDR-H2	I	I	I	I	I	I
52	52	52	CDR-H2	N	S	S	N	N	N
52A	52A	53	CDR-H2	N	T	S	N	N	N
53	53	54	CDR-H2	S	D	G	S	S	S
54	54	55	CDR-H2	G	G	G	G	G	G
55	55	56	CDR-H2	D	S	S	D	D	D
56	56	57	CDR-H2	T	F	Y	T	T	T
57	57	58	CDR-H2	T	I	T	T	T	T
58	58	59	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
59	59	60	CDR-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
60	60	61	CDR-H2	P	A	P	P	P	P
61	61	62	CDR-H2	D	D	D	D	D	D
62	62	63	CDR-H2	T	T	S	T	T	T
63	63	64	CDR-H2	V	V	V	V	V	V
64	64	65	CDR-H2	K	K	K	K	K	K
65	65	66	CDR-H2	G	G	G	G	G	G
66	66	67	Fr3	R	R	R	R	R	R
67	67	68	Fr3	F	F	F	F	F	F
68	68	69	Fr3	T	T	T	T	T	T
69	69	70	Fr3	I	I	I	I	I	I

Bảng 13

Các vùng Vh 14G8 được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	14G8 VH chuột (SEQ ID NO: 61)	Fr nhận Hu VH Acc# AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Fr nhận Hu VH Acc# AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
70	70	71	Fr3	S	S	S	S	S	S
71	71	72	Fr3	R	G	R	R	R	R
72	72	73	Fr3	D	D	D	D	D	D
73	73	74	Fr3	N	N	N	N	N	N
74	74	75	Fr3	A	S	A	A	A	A
75	75	76	Fr3	K	K	K	K	K	K
76	76	77	Fr3	N	N	N	N	N	N
77	77	78	Fr3	T	T	T	T	T	T
78	78	79	Fr3	L	L	L	L	L	L
79	79	80	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
80	80	81	Fr3	L	L	L	L	L	L
81	81	82	Fr3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
82	82	83	Fr3	M	M	M	M	M	M
82A	82A	84	Fr3	S	N	S	S	S	N
82B	82B	85	Fr3	S	S	S	S	S	S
82C	82C	86	Fr3	L	L	L	L	L	L
83	83	87	Fr3	K	R	K	K	K	R
84	84	88	Fr3	S	A	S	S	S	A
85	85	89	Fr3	E	E	E	E	E	E
86	86	90	Fr3	D	D	D	D	D	D
87	87	91	Fr3	T	T	T	T	T	T
88	88	92	Fr3	A	A	A	A	A	A
89	89	93	Fr3	M	V	M	M	M	V
90	90	94	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
91	91	95	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
92	92	96	Fr3	C	C	C	C	C	C
93	93	97	Fr3	A	A	A	A	A	A
94	94	98	Fr3	R	K	R	R	R	R
95	95	99	CDR-H3	H	D	L	H	H	H
96	96	100	CDR-H3	Y	R	Y	Y	Y	Y
97	97	101	CDR-H3	Y	G	Y	Y	Y	Y
98	98	102	CDR-H3	Y	I	G	Y	Y	Y
99	99	103	CDR-H3	G	D	Y	G	G	G
100	100	104	CDR-H3	G	A	R	G	G	G
100A	100A	105	CDR-H3	G	T	Y	G	G	G

Bảng 13

Các vùng Vh 14G8 được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	14G8 VH chuột (SEQ ID NO: 61)	Fr nhận Hu VH Acc# AAD30410.1 (SEQ ID NO: 63)	Fr nhận Hu VH Acc# AAX82494.1 (SEQ ID NO: 4)	Hu14G8 VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Hu14G8 VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Hu14G8 VHv3 (SEQ ID NO: 66)
100B	100B	106	CDR-H3	Y	A	Y	Y	Y	Y
100C	100C	107	CDR-H3	G	Q	F	G	G	G
100D	100D	108	CDR-H3	G	V	-	G	G	G
100E	100E	109	CDR-H3	W	G	-	W	W	W
100F	100F	110	CDR-H3	F	R	-	F	F	F
100G	100G	111	CDR-H3	F	F	-	F	F	F
101	101	112	CDR-H3	D	D	D	D	D	D
102	102	113	CDR-H3	V	P	Y	V	V	V
103	103	114	Fr4	W	W	W	W	W	W
104	104	115	Fr4	G	G	G	G	G	G
105	105	116	Fr4	T	Q	Q	T	Q	Q
106	106	117	Fr4	G	G	G	G	G	G
107	107	118	Fr4	T	T	T	T	T	T
108	108	119	Fr4	T	L	M	L	L	L
109	109	120	Fr4	V	V	V	V	V	V
110	110	121	Fr4	T	T	T	T	T	T
111	111	122	Fr4	V	V	V	V	V	V
112	112	123	Fr4	S	S	S	S	S	S
113	113	124	Fr4	S	S	S	S	S	S

Bảng 14

Các vùng Vk 14G8 được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	VL 14G8 chuột (SEQ ID NO: 70)	Fr nhận Hu VL Acc# ABA71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Fr nhận Hu VL Acc# ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
1	1	1	Fr1	D	D	D	D	D	D
2	2	2	Fr1	I	I	I	I	I	I
3	3	3	Fr1	V	V	V	V	V	V
4	4	4	Fr1	M	M	M	M	M	M
5	5	5	Fr1	T	T	T	T	T	T
6	6	6	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
7	7	7	Fr1	A	T	S	S	S	S
8	8	8	Fr1	A	P	P	A	P	P
9	9	9	Fr1	P	L	L	P	L	L
10	10	10	Fr1	S	S	S	S	S	S
11	11	11	Fr1	V	L	L	L	L	L
12	12	12	Fr1	P	P	P	P	P	P
13	13	13	Fr1	V	V	V	V	V	V
14	14	14	Fr1	T	T	T	T	T	T
15	15	15	Fr1	P	P	P	P	P	P
16	16	16	Fr1	G	G	G	G	G	G
17	17	17	Fr1	E	E	E	E	E	E
18	18	18	Fr1	S	S	P	S	P	P
19	19	19	Fr1	V	A	A	V	A	A
20	20	20	Fr1	S	S	S	S	S	S
21	21	21	Fr1	I	I	I	I	I	I
22	22	22	Fr1	S	S	S	S	S	S
23	23	23	Fr1	C	C	C	C	C	C
24	24	24	CDR-L1	R	R	R	R	R	R
25	25	25	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
26	26	26	CDR-L1	N	S	N	N	N	S
27	27	27	CDR-L1	K	Q	Q	K	K	K
27A	27A	28	CDR-L1	S	S	S	S	S	S
27B	27B	29	CDR-L1	L	L	L	L	L	L
27C	27C	30	CDR-L1	L	R	L	L	L	L
27D	27D	31	CDR-L1	H	H	Y	H	H	H
27E	27E	32	CDR-L1	S	Y	S	S	S	S
27F	27F	33	CDR-L1	N	S	N	N	N	N
28	28	34	CDR-L1	G	G	G	G	G	G
29	29	35	CDR-L1	N	Y	Y	N	N	N

Bảng 14

Các vùng Vk 14G8 được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	VL 14G8 chuột (SEQ ID NO: 70)	Fr nhận Hu VL Acc# ABA71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Fr nhận Hu VL Acc# ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
30	30	36	CDR-L1	T	T	N	T	T	T
31	31	37	CDR-L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
32	32	38	CDR-L1	L	I	L	L	L	L
33	33	39	CDR-L1	Y	D	D	Y	Y	Y
34	34		CDR-L1						
35	35	40	Fr2	W	W	W	W	W	W
36	36	41	Fr2	F	Y	Y	F	F	F
37	37	42	Fr2	L	L	L	L	L	L
38	38	43	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
39	39	44	Fr2	R	K	K	K	K	K
40	40	45	Fr2	P	P	P	P	P	P
41	41	46	Fr2	G	G	G	G	G	G
42	42	47	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
43	43	48	Fr2	S	S	S	S	S	S
44	44	49	Fr2	P	P	P	P	P	P
45	45	50	Fr2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
46	46	51	Fr2	L	V	L	L	L	L
47	47	52	Fr2	L	L	L	L	L	L
48	48	53	Fr2	I	I	I	I	I	I
49	49	54	Fr2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
50	50	55	CDR-L2	R	L	S	R	R	R
51	51	56	CDR-L2	V	G	G	V	V	V
52	52	57	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
53	53	58	CDR-L2	N	N	N	N	N	N
54	54	59	CDR-L2	L	R	R	L	L	L
55	55	60	CDR-L2	A	A	A	A	A	A
56	56	61	CDR-L2	S	S	S	S	S	S
57	57	62	Fr3	G	G	G	G	G	G
58	58	63	Fr3	V	V	V	V	V	V
59	59	64	Fr3	P	P	P	P	P	P
60	60	65	Fr3	D	D	D	D	D	S
61	61	66	Fr3	R	R	R	R	R	R
62	62	67	Fr3	F	F	F	F	F	F
63	63	68	Fr3	S	S	S	S	S	S
64	64	69	Fr3	G	G	G	G	G	G

Bảng 14

Các vùng Vk 14G8 được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	VL 14G8 chuột (SEQ ID NO: 70)	Fr nhận Hu VL Acc# ABA71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Fr nhận Hu VL Acc# ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
65	65	70	Fr3	S	S	S	S	S	S
66	66	71	Fr3	G	G	G	G	G	G
67	67	72	Fr3	S	S	S	S	S	S
68	68	73	Fr3	G	G	G	G	G	G
69	69	74	Fr3	T	T	T	T	T	T
70	70	75	Fr3	A	D	D	A	D	D
71	71	76	Fr3	F	F	F	F	F	F
72	72	77	Fr3	T	T	T	T	T	T
73	73	78	Fr3	L	L	L	L	L	L
74	74	79	Fr3	R	K	K	K	K	K
75	75	80	Fr3	I	I	I	I	I	I
76	76	81	Fr3	S	S	S	S	S	S
77	77	82	Fr3	R	R	R	R	R	R
78	78	83	Fr3	V	V	V	V	V	V
79	79	84	Fr3	E	E	E	E	E	E
80	80	85	Fr3	A	A	A	A	A	A
81	81	86	Fr3	E	E	E	E	E	E
82	82	87	Fr3	D	D	D	D	D	D
83	83	88	Fr3	V	V	V	V	V	V
84	84	89	Fr3	G	G	G	G	G	G
85	85	90	Fr3	V	V	V	V	V	V
86	86	91	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
87	87	92	Fr3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
88	88	93	Fr3	C	C	C	C	C	C
89	89	94	CDR-L3	M	M	M	M	M	M
90	90	95	CDR-L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
91	91	96	CDR-L3	H	A	A	H	H	H
92	92	97	CDR-L3	L	L	L	L	L	L
93	93	98	CDR-L3	E	Q	Q	E	E	E
94	94	99	CDR-L3	Y	T	S	Y	Y	Y
95	95	100	CDR-L3	P	V	P	P	P	P
96	96	101	CDR-L3	L	C	Y	L	L	L
97	97	102	CDR-L3	T	S	T	T	T	T
98	98	103	Fr4	F	F	F	F	F	F
99	99	104	Fr4	G	G	G	G	G	G

Bảng 14

Các vùng Vk 14G8 được làm tương thích với người

Gốc Chothia #	Gốc Kabat #	Gốc tuyến tính #	FR hoặc CDR	VL 14G8 chuột (SEQ ID NO: 70)	Fr nhận Hu VL Acc# ABA71374.1 (SEQ ID NO: 72)	Fr nhận Hu VL Acc# ABC66952.1 (SEQ ID NO: 73)	Hu14G8 VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Hu14G8 VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Hu14G8 VLv3 (SEQ ID NO: 76)
100	100	105	Fr4	A	Q	Q	Q	Q	Q
101	101	106	Fr4	G	G	G	G	G	G
102	102	107	Fr4	T	T	T	T	T	T
103	103	108	Fr4	K	K	K	K	K	K
104	104	109	Fr4	L	L	L	L	L	L
105	105	110	Fr4	E	E	E	E	E	E
106	106	111	Fr4	L	I	I	I	I	I
106A	106A	112	Fr4	K	K	K	K	K	K
107	107	113	Fr4	R	R	R	R	R	R

Bảng 15

Các đột biến ngược V_H, V_L và các đột biến khác

Biến thể V_H hoặc V_L	Trình tự nhận exon V_H hoặc V_L	Các gốc khung cho	Các gốc CDR Kabat
Hu14G8VHv1 (SEQ ID NO: 64)	Mã truy cập NCBI là AAD30410.1 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 và 4, tương ứng)	H1, H3, H47, H105	-
Hu14G8VHv2 (SEQ ID NO: 65)	Mã truy cập NCBI là AAD30410.1 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 và 4, tương ứng)	H1, H47	-
Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 66)	Mã truy cập NCBI là AAD30410.1 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 và 4, tương ứng)	H1, H47	-
Hu14G8VLv1 (SEQ ID NO: 74)	Mã truy cập NCBI là ABA71374.1 và ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 và 73, tương ứng)	L8, L9, L19, L36, L70	-
Hu14G8VLv2 (SEQ ID NO: 75)	Mã truy cập NCBI là ABA71374.1 và ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 và 73, tương ứng)	L36	-
Hu14G8VLv3 (SEQ ID NO: 76)	Mã truy cập NCBI là ABA71374.1 và ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 và 73, tương ứng)	L36, L60	L26

Bảng 16

Đánh số Kabat các gốc khung và CDR Kabat cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong vùng VH kháng thể 14G8 được làm tương thích với người

Gốc	AAD30410.1 Chuỗi nặng	AAX82494.1 Chuỗi nặng	14G8 chuột	Hu14G8 VHv1	Hu14G8 VHv2	Hu14G8 VHv3
H1	Q	Q	E	E	E	E
H3	Q	Q	K	K	Q	Q
H47	W	W	L	L	L	L
H105	Q	Q	T	T	Q	Q

Bảng 17

Đánh số Kabat các gốc khung và CDR Kabat cho các đột biến ngược và các đột biến khác trong vùng VL kháng thể 14G8 được làm tương thích với người

Gốc	ABA71374.1 Chuỗi nhẹ	ABC66952.1 Chuỗi nhẹ	14G8 chuột	Hu14G8 VLv1	Hu14G8 VLv2	Hu14G8 VLv3
L8	P	P	A	A	P	P
L9	L	L	P	P	L	L
L19	A	A	V	V	A	A
L26	S	N	N	N	N	S
L36	Y	Y	F	F	F	F
L60	D	D	D	D	D	S
L70	D	D	A	A	D	D

Sự canh thẳng trình tự 14G8 Vh chuột (SEQ ID NO: 61) với trình tự mẫu của chuột (1MQK_H; SEQ ID NO: 62), các trình tự nhận của người (AAD30410.1 và AAX82494.1; SEQ ID NO: 63 và 4, tương ứng), và các trình tự Hu14G8VHv1, Hu14G8VHv2, và Hu14G8VHv3 (SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66, tương ứng), được thể hiện trong Fig.2A. Các CDR như được xác định bởi Kabat được đóng khung, ngoại trừ khung đầu tiên là thể liên hợp CDR-H1 Chothia và CDR-H1 Kabat, với CDR-H1 Kabat được gạch

chân và in đậm. Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc, vernier, hoặc 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 nền vernier/CDR bao gồm các gốc 2, 49, 69, 71, 75, 80, và 94 theo cách đánh số Kabat trong bảng 13. Ví dụ về các gốc tương tác chính tắc/CDR bao gồm các gốc 24, 48, và 73 theo cách đánh số Kabat trong bảng 13. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/đóng gói (VH+VL) bao gồm các gốc 37, 39, 44, 47, 91, 93, và 103 theo cách đánh số Kabat trong bảng 13.

Sự canh thẳng trình tự 9D5 Vk 14G8 chuột (SEQ ID NO: 70) với trình tự mẫu của chuột (1MJU_L; SEQ ID NO: 71), các trình tự nhận của người (ABA71374.1 và ABC66952.1; SEQ ID NO: 72 và 73, tương ứng), và các trình tự Hu14G8VLv1, Hu14G8VLv2, Hu14G8VLv3 (SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76, tương ứng), được thể hiện trong Fig.2B. Các CDR như được xác định bởi Kabat được đóng khung, ngoại trừ khung đầu tiên là thể liên hợp CDR-H1 Chothia và CDR-H1 Kabat, với CDR-H1 Kabat được gạch chân và in đậm. Các vị trí mà tại đó các gốc chính tắc, vernier, hoặc 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 nền vernier/CDR bao gồm các gốc 4, 35, 46, 49, 66, 68, và 69 theo cách đánh số Kabat trong bảng 14. Ví dụ về các gốc tương tác chính tắc/CDR bao gồm các gốc 2, 48, 64, và 71 theo cách đánh số Kabat trong bảng 14. Ví dụ về các gốc mặt phân cách/đóng gói (VH+VL) bao gồm các gốc 36, 38, 44, 47, 87, và 98 theo cách đánh số Kabat trong bảng 14.

Lý do để lựa chọn các vị trí được chỉ ra trong bảng 15 và 17 trong vùng biến đổi chuỗi nhẹ làm ứng viên cho sự thế là như sau.

P8A: Prolin là quan trọng với hình dạng cấu trúc, và sự mất hoặc thêm prolin có thể ảnh hưởng đến cấu trúc này. Các đột biến ngược được thiết kế để tránh "thêm prolin". Tuy nhiên, vì A hiếm khi ở vị trí này trong các khung IgG người, P được đưa vào trong một số dạng.

L9P: Prolin là quan trọng với hình dạng cấu trúc, và sự mất hoặc thêm prolin có thể ảnh hưởng đến cấu trúc này. Các đột biến ngược được thiết kế để tránh "sự mất prolin". Tuy nhiên, vì P hiếm khi ở vị trí này trong khung IgG người, L được đưa vào trong một số dạng.

A19V: A và V có tần số xuất hiện tương đương trong các khung người. Cả hai gốc được đưa vào trong các dạng riêng biệt.

N26S: L26 là vị trí N-glycosyl hóa trong CDR1 chuỗi nhẹ. Đột biến thành S làm giảm sự N-glycosyl hóa và tạo ra sản phẩm không đồng nhất hơn.

Y36F: Đây là gốc trên mặt phân cách. Đột biến thế được tạo ra trong một số dạng để giữ gốc chuột ở gốc nằm trên mặt phân cách này.

D60S: D và S là tương tự về tần số xuất hiện trong các khung IgG người. S được sử dụng bởi hầu hết các kháng thể điều trị đã có trên thị trường, do đó D được thay thế bằng S trong một số dạng.

D70A: D xuất hiện thường xuyên hơn nhiều so với A trong các khung IgG người. Tuy nhiên, D sẽ tạo liên kết ion hóa với R24 trong CDR1 chuỗi nhẹ, do đó cả A và D được bao gồm trong các dạng riêng biệt.

Lý do để lựa chọn các vị trí được chỉ ra trong bảng 15 và 16 trong vùng biến đổi chuỗi nặng làm ứng viên cho sự thế là như sau.

Q1E: Sự chuyển hóa glutamat (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 này 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.

Q3K: Q có tần số xuất hiện cao hơn trong các khung IgG người. K có tần số xuất hiện thấp hơn nhưng không phải là hiếm. Cả hai gốc được bao gồm trong các dạng riêng biệt.

W47L: Đây là gốc trên mặt phân cách. Đột biến thế được tạo ra trong một số dạng để giữ gốc chuột ở gốc trên mặt phân cách này.

Q105T: T có thể tạo ra liên kết hyđro với K3, nhờ đó T được bao gồm trong một số dạng để duy trì cấu trúc hình dạng của VH.

Vì hai khung nhận của người (ABA71374.1 và ABC66952.1 (SEQ ID NO: 72 và 73, tương ứng)) được sử dụng để làm tương thích với người vùng biến đổi chuỗi nhẹ 14G8, có một số vị trí khung mà có các axit amin khác nhau trong hai khung nhận này. Các dạng được làm tương thích với người của vùng biến đổi chuỗi nhẹ 14G8 có thể bao gồm mỗi axit amin ở các gốc này. Ví dụ về gốc trong đó hai khung nhận này khác nhau là vị trí L18

(S hoặc P) theo cách đánh số Kabat. Lý do để chọn một axit amin hay axit amin còn lại ở vị trí này là như sau.

L18 (S hoặc P): P xuất hiện ở vị trí này với tần số thấp hơn. Đột biến thành S được thử để làm giảm sự méo vòng.

Vì hai khung nhận của người (AAD30410.1 và AAX82494.1 (SEQ ID NO: 63 và 4, tương ứng)) cũng được sử dụng làm các trình tự nhận để làm tương thích với người vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành 14G8, có một số vị trí khung mà có các axit amin khác nhau trong hai khung nhận này. Các dạng được làm tương thích với người của vùng biến đổi chuỗi nặng 14G8 có thể bao gồm mỗi axit amin ở các gốc này. Ví dụ về các gốc trong đó hai khung nhận này khác nhau bao gồm các vị trí H82a (N hoặc S), H83 (R hoặc K), H84 (A hoặc S), và H89 (V hoặc M) theo cách đánh số Kabat. Lý do để chọn một axit amin hay axit amin còn lại ở các vị trí này là như sau.

H82a (N hoặc S): N và S có tần số xuất hiện tương tự trên 82a. Chúng cũng là các gốc người trong hai khuôn VH người. S và N được bao gồm trong các dạng riêng biệt.

H83 (R hoặc K): K trong vùng khung 3 là gần với vùng bề mặt liên kết CDR. Việc thay thế nó bằng R có thể che khuất vị trí của kháng nguyên. R có tần số xuất hiện cao nhất và K có tần số xuất hiện cao thứ ba trong các khung người ở vị trí này. R và K được bao gồm trong các dạng riêng biệt.

H84 (A hoặc S): S và A có mặt trong hai khung được xem xét, do đó mỗi gốc được thử trong các dạng riêng biệt.

H89 (V hoặc M): V và M có mặt trong hai khung được xem xét, do đó mỗi gốc được thử trong các dạng riêng biệt.

Ba biến thể vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người và ba biến thể vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người là như sau:

Hu14G8VL kiểu 1 (đột biến thế P8A, L9P, A19V, Y36F, D70A thể hiện bằng chữ thường):

DIVMTQSapSLPVTPGESvSISCRSNKSLLHSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVS NLASGVPDRFSGSGSGTaFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK R (SEQ ID NO: 74)

Hu14G8VL kiểu 2 (đột biến thế L36F thể hiện bằng chữ thường):

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSNKSLLHSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRV SNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEI KR (SEQ ID NO: 75)

Hu14G8VL kiểu 3 (đột biến thế N26S, L36F, và D60S thể hiện bằng chữ thường):

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSsKSLLHSNGNTYLYWfLQKPGQSPQLLIYRVS NLASGVPsRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK R (SEQ ID NO: 76)

Hu14G8VH kiểu 1 (các đột biến thế Q1E, Q3K, W47L, và Q105T thể hiện bằng chữ thường):

eVkLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEIVAEINNSG DTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGG WFFDVWGtGTLVTVSS (SEQ ID NO: 64)

Hu14G8VH kiểu 2 (các đột biến thế Q1E và W47L thể hiện bằng chữ thường):

eVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEIVAEINNSG DTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMSSLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGG WFFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 65)

Hu14G8VH kiểu 3 (các đột biến thế Q1E và W47L thể hiện bằng chữ thường):

eVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPEKRLEIVAEINNSG DTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGG WFFDVWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 66)

Ví dụ 10. Phân tích động học sự liên kết của các kháng thể 14G8 được làm tương thích với người

Các động học liên kết của ba biến thể 14G8 được làm tương thích với người và 14G8 chuột với TTR F87M/L110M người tái tổ hợp được mô tả bằng Biacore, như được thể hiện trong bảng 18. Kháng thể kháng người (GE Healthcare) được bất động trên chip cảm biến C5 (thiếu chuỗi dextran) bằng cách tạo cặp amin theo các hướng dẫn được cung cấp trong kit kháng người GE Healthcare, và các mAb được bắt giữ đến mức độ đảm bảo sự liên kết tối đa của chất phân tích là 30-50 RU. Nhiều nồng độ khác nhau của chất phân

tích (TTR F87M/L110M người tái tổ hợp) được cho qua phối tử đã bị bắt ở tốc độ 50 ul/phút trong đệm chạy (HBS + 0,05% P-20, 1 mg/mL BSA) trong các dung dịch pha loãng 3 lần. Đối với mỗi nồng độ, phản ứng xảy ra trong khung thời gian cho phép các nồng độ chất phân tích cao hơn đạt tới trạng thái cân bằng trong quá trình liên hợp, cũng như ít nhất là 10% tín hiệu giảm xuống trong quá trình phân ly. Ít nhất là một nồng độ (không phải cao nhất hoặc thấp nhất) được chạy hai lần. Các khoảng nồng độ chất phân tích được chọn dựa trên thử nghiệm sơ bộ để bao trùm ít nhất là 10 lần trên K_D đến 10 lần dưới K_D.

Bảng 18 tổng kết tốc độ liên hợp (k_a), tốc độ phân ly (k_d), và hằng số ái lực liên kết (K_D) của 14G8 chuột, 14G8 khảm, Hu14G8 H2L1, Hu14G8 H2L2, Hu14G8H2L3, và Hu14G8 H3L1 đối với TTR F87M/L110M người tái tổ hợp. Như được thể hiện trong bảng 18, các kháng thể Hu14G8 và 14G8 chuột có ái lực liên kết TTR tương tự nhau.

Bảng 18

Ái lực liên kết kháng nguyên của các kháng thể 14G8 với TTR người (F87M/L110M)

Kháng thể	k_a (1/Ms)	k_d (1/s)	K_D (M)	Rmax
14G8 chuột	2,88E+04	5,36E-04	1,86E-08	27,13
14G8 khảm	2,51E+05	3,46E-04	1,38E-09	51,06
Hu14G8 H2L1	3,07E+05	6,93E-04	2,26E-09	42,03
Hu14G8 H2L2	3,26E+05	6,83E-04	2,10E-09	51,43
Hu14G8 H2L3	2,52E+05	3,18E-04	1,24E-09	42,41
Hu14G8 H3L1	3,86E+05	6,77E-04	1,76E-09	44,05

14G8 chuột, 14G8 khảm, và các dạng được làm tương thích với người khác của 14G8 mà không có thay đổi trong LCDR1 thể hiện các chuỗi nhẹ bổ sung khi chạy trên SDS-PAGE trong các điều kiện khử. Phân tích trình tự chỉ ra rằng có vị trí N-glycosyl hóa trong LCDR1 ở gốc 26 theo cách đánh số Kabat. Vị trí N-glycosyl hóa này có thể gây ra

các vấn đề tiềm tàng về tính không tương đồng trong quá trình sản xuất. Đột biến của N ở gốc L26 trong Hu14G8VLv2 tạo ra Hu14G8VLv3. Các kháng thể được làm tương thích với người có Hu14G8VLv3 chỉ thể hiện một chuỗi nhẹ khi chạy trên SDS-PAGE trong các điều kiện khử, do đó loại bỏ các vấn đề tiềm tàng về tính không tương đồng. Ái lực liên kết kháng nguyên của Hu14G8 H2L3 là tương tự với của kháng thể mẹ của chuột và kháng thể khảm.

Ví dụ 11. Nguyên liệu và phương pháp

a. Quy trình tạo ra kháng thể

Chuột được gây miễn dịch hàng tuần bằng các peptit kháng nguyên TTR-MAP, TTR89-97-N-KLH hoặc TTR89-97-C-KLH trong tá dược RIBI hoặc hàng tháng trong tá dược TiterMax. Ba đến bốn ngày trước khi dung hợp, chuột đã chọn được cho liều IV tăng cường cuối cùng với chất kháng nguyên trong dung dịch nước muối. Lách được đồng nhất để tạo ra tế bào lách và dung hợp với tế bào u tủy SP2/0 bằng cách sử dụng quy trình dung hợp bằng điện chuẩn. Tế bào đã dung hợp trong môi trường chọn lọc được đưa vào các đĩa 96 lỗ và được sàng lọc sau 7-10 ngày.

b. Quy trình sàng lọc kháng thể

Việc chọn lọc thể lai là dựa trên sự sàng lọc ELISA sau đây: các đĩa ELISA 96 lỗ được phủ bằng kháng thể gà kháng His, 1 µg/mL PBS và được ủ trong 1 giờ. Các đĩa được phong bế bằng dung dịch 1% BSA/PBS, 200 uL/lỗ trong 15 phút, sau đó 0,5 µg/mL pH4-TTR, 50 µL/lỗ được bổ sung vào và được ủ trong 1 giờ. pH4-TTR là TTR đã được đưa vào độ pH thấp (50 mM natri axetat, độ pH=4,0) để phân ly/kết tụ TTR, bộc lộ epitop TTR89-97. Các đĩa được rửa hai lần bằng TBS-T. Dịch nổi từ các đĩa dung hợp được bổ sung vào, 50 µL/lỗ và được ủ trong 1 giờ. Các đĩa được rửa hai lần bằng TBS-T. Kháng thể phát hiện, HRP dê kháng chuột (đặc hiệu IgG1, 2a, 2b, 3) đã pha loãng 1:5.000 trong 0,5% BSA/PBS/TBS-T, 50 µL/lỗ được bổ sung vào và được ủ trong 1 giờ. Cuối cùng, các đĩa được rửa năm lần bằng TBS-T và cơ chất TMB, 100 µL/lỗ được bổ sung vào. Sau 15 phút, sự phát triển cơ chất được dừng lại bằng 2N axit sulfuric, 50 µL/lỗ. Các đĩa được đọc ở 450 nm. Các lỗ có O.D. > 1,0 được chọn và tế bào được chuyển sang đĩa 24 lỗ. Sau 3 ngày sinh trưởng, các dòng được quét bằng máy đếm với thử nghiệm trên đây để xác nhận sự liên kết, và sự thay thế TTR tự nhiên bằng pH4-TTR làm chất sàng lọc đếm âm, cho phép lựa chọn các dòng sản sinh mAb TTR đặc hiệu với các dạng không tự nhiên của TTR.

c. Quy trình biểu hiện kháng thể

Các plasmit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được điều khiển bởi CMV mang các trình tự kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người được chuyển vào tế bào CHO-S1 (Life Technology). Kỹ thuật chọn lọc hai lần được áp dụng để tạo ra tập hợp được chọn. Môi trường có điều kiện được thử nghiệm về hiệu giá, khả năng liên kết và được phân tích bằng SDS-PAGE/Thẩm tách Western. Các tập hợp đã chọn được sử dụng để tạo dòng bằng cách sử dụng hệ Clonepix (Molecular Devices). Các dòng được xếp loại dựa vào hiệu giá kháng thể. Các dòng được chọn được mở rộng và tạo ngân hàng.

Dòng có năng suất cao nhất được mở rộng vào các bình thót cổ lắc và môi trường nuôi cấy này được sử dụng để chủng vào các môi trường nuôi cấy túi Wave 10–25L. Hỗn hợp của môi trường biểu hiện FreeStyle-CHO, CD OptiCHO và FreeStyle F17 được bổ sung bằng Glutamax (môi trường và Glutamax từ Life Technology) được sử dụng cho bình thót cổ lắc cũng như cho các môi trường nuôi cấy túi Wave. Việc nuôi cấy theo mẻ được thực hiện bằng cách sử dụng thiết bị phản ứng sinh học Wave (GE Healthcare) ở 37°C, 7% CO_2 kèm theo khuấy liên tục. Các mẫu được hút ra định kỳ để theo dõi số lượng tế bào, khả năng sống sót và sự sản sinh kháng thể. Việc bổ sung Chất kích hoạt tế bào (HyClone) được thực hiện nếu cần. Môi trường nuôi cấy mẻ được thu hoạch khi khả năng sống của tế bào bắt đầu giảm xuống dưới 90% (5 -7 ngày).

d. Quy trình tinh chế kháng thể

Môi trường nuôi cấy tế bào được thu hoạch sau khi cho phép tế bào trong huyền phù lắng xuống đáy của túi Wave nhờ trọng lực ở 4°C. Môi trường đã thu hoạch được lọc qua thiết bị lọc sâu (Millistak Pod COHC, Millipore), được cô đặc 10 lần bằng thiết bị lọc dòng tiếp tuyến (Pelicon 2PLC 30K, Millipore) và được lọc vô khuẩn qua thiết bị lọc 0,2 µm (Opticap XL, Millipore). Môi trường có điều kiện đã cô đặc sau đó được đưa lên cột dòng nhanh Protein G Sepharose (GE Lifesciences), được cân bằng sơ bộ trong 1xPBS, độ pH=7,4 bằng cách sử dụng FPLC (Akta Avant, GE Lifesciences). Các protein chưa liên kết được rửa khỏi cột bằng 5-10 thể tích cột của 1xPBS, độ pH=7,4 đến khi OD_{280} đạt tới đường cơ sở. Kháng thể đã liên kết được rửa giải khỏi cột bằng 2 thể tích cột của Đệm rửa giải IgG (Thermo Scientific). Các phân đoạn rửa giải được thu gom và độ pH được trung hòa bằng 2M Tris, độ pH=9,0 (60 µL mỗi 1ml dung dịch rửa giải).

Các phân đoạn chứa kháng thể được gom lại và được thẩm tách qua đêm ở 4°C khỏi 1xPBS, độ pH=7,4. Sau đó các mẫu đã thẩm tách được vô trùng bằng kỹ thuật siêu lọc qua thiết bị lọc 0,2 µm PES và được bảo quản ở 4°C. Nồng độ protein cuối cùng được xác định bằng bằng axit bicinchoninic (BCA) bằng cách sử dụng gama-globulin bò làm chuẩn protein (Thermo Scientific).

e. Các quy trình biểu hiện và tinh chế TTR tái tổ hợp

Tế bào E. coli (BL21-A1) được biến nạp bằng plasmit pET21a(+) chứa (Met-hTTR-$(His)_6$ gắn xen TTR hoặc biến thể TTR chứa đột biến kép F87M/L110M. Tế bào được nuôi trong canh thang 2YT chứa 100 µg/mL ampixilin. Sự biểu hiện TTR được cảm ứng qua đêm ở 20°C khi có mặt 1mM IPTG và 005% arabinoza.

Tế bào được thu gom bằng cách ly tâm ở tốc độ 4000 x g trong 10 phút và được bảo quản ở -80°C đến khi sử dụng. 10-15g pelet tế bào được làm tan và được dung giải trong 50ml Đệm A (1xPBS chứa 500 mM NaCl, 20mM imidazol) bằng cách xử lý qua thiết bị xử lý cắt tốc độ cao LV-1 (Microfluidics, Inc.). Tế bào đã dung giải được ly tâm ở tốc độ 12.000 x g trong 15 phút, được lọc qua thiết bị lọc 0,2 µm PES trước khi tinh chế trên cột His-Trap HP (GE Lifesciences). Sau khi nạp, cột được rửa bằng 10 thể tích cột của Đệm A và được rửa giải bằng Đệm B (1xPBS với 500 mM NaCl, 500 mM imidazol). Các phân đoạn đỉnh tương ứng với TTR được thu gom, được thẩm tách khỏi 1xPBS và được bảo quản ở -80°C đến khi sử dụng.

f. Bào chế kháng nguyên TTR

Kháng nguyên TTR tự nhiên được bào chế bằng cách pha loãng dung dịch gốc cô đặc chứa TTR-6His tái tổ hợp đến nồng độ cuối cùng là 2,5 µg/mL trong 1x PBS. TTR được xử lý bằng độ pH=4 được tạo ra bằng cách ủ TTR tái tổ hợp ở nồng độ là 0,2 mg/mL trong 50mM natri axetat, độ pH=3,95 trong 72 giờ ở nhiệt độ phòng. Trong các điều kiện này, TTR phân ly thành hỗn hợp của các monome TTR và các dạng kết tụ khác biệt về cấu trúc với TTR tự nhiên. Sau đó, pH4-TTR được pha loãng đến nồng độ cuối cùng là 2,5 µg/mL trong 1xPBS ngay trước khi sử dụng trong thử nghiệm này. Các đĩa 96 lỗ (Costar #3690) được phủ ở nhiệt độ phòng bằng 50 µl mỗi lỗ 1,0 µg/mL kháng thể đa dòng của gà kháng his (Abcam #Ab9107) trong 1xPBS trong 1 giờ. Dung dịch phủ này được loại bỏ và đĩa này được phong bế bằng thể tích 250 µL mỗi lỗ của dung dịch đệm phong bế chứa 1x BSA được pha loãng trong 1xPBS (G-Biosciences #786-193) trong 1 giờ.

g. Quy trình ELISA

Các đĩa 96 lỗ đã phủ và phong bế được xử lý bằng 50 µL mỗi lỗ 2,5 µg/mL kháng nguyên TTR (TTR tự nhiên hoặc pH4-TTR) trong 1 giờ, ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các đĩa này được rửa hai lần bằng 250 µL mỗi lỗ dung dịch đệm rửa (1x Nước muối đệm Tris chứa 0,05% Tween-20). Sau đó, các đĩa đã rửa được xử lý bằng 50 µL mỗi lỗ kháng thể đơn dòng kháng TTR thích hợp ở các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,31 đến 2,5 µg/ml, trong 1 giờ.

Các đĩa đã xử lý được rửa 3 lần bằng 250 µL dung dịch đệm rửa mỗi lỗ. Sau khi rửa, các đĩa được xử lý trong 1 giờ bằng 50 µL kháng thể phát hiện trong mỗi lỗ chứa dung dịch pha loãng 1:5.000 của kháng thể dê kháng chuột liên hợp peroxit (Jackson ImmunoResearch #115-035-164) trong 1xPBS. Sau đó đĩa này được rửa 3 lần trước khi bổ sung 100 µL mỗi lỗ cơ chất TMB (Rockland). Phản ứng HRP được để cho tiếp tục ở nhiệt độ phòng trong 15 phút, trước khi dập tắt bằng thể tích 50 µL 1N H_2SO_4 mỗi lỗ. Độ hấp thụ quang phổ được đo ở bước sóng 450nm.

h. SDS-PAGE

Điện di trên các gel SDS-polyacrylamit được thực hiện như sau. 0,1-1 µg TTR hoặc pH 4,0-TTR trong dung dịch đệm mẫu 1xLDS (Life Technologies) được nạp lên gel NuPAGE bis-tris 10% và được điện di trong dung dịch đệm MES ở 90V không đổi trong 105 phút. Sau khi điện di, gel này được nhuộm trong Xanh Instant (Expedeon) hoặc được chuyển sang thiết bị lọc nitroxenluloza để phân tích thẩm tách Western.

i. Native-PAGE

Điện di trên các gel Native Tris-glyxin được thực hiện như sau. 0,1-1 µg TTR hoặc pH 4,0-TTR trong dung dịch đệm mẫu 1xTris-glyxin (Life Technologies) được nạp lên gel 10-20% Tris-glyxin và được điện di trong dung dịch đệm chạy 1x Native Tris-glyxin ở 120V không đổi trong 105 phút. Sau khi điện di, gel này được nhuộm trong Xanh Instant (Expedeon) hoặc được chuyển vào các thiết bị lọc nitroxenluloza để phân tích thẩm tách Western.

j. Thẩm tách Western

Gel SDS hoặc Native- PAGE được thẩm tách lên giấy lọc nitroxenluloza (iBlot, P7 Program) và được phong bế bằng dung dịch đệm phong bế (Licor) trong 30 phút. Sau đó

giấy lọc này được ủ trong 0,5 µg/mL kháng thể sơ cấp trong dung dịch đệm phong bế trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng (hoặc qua đêm ở 4°C), sau đó là 3 lần rửa 10 phút bằng 1xTBS. Các giấy lọc được đặt vào kháng thể thứ cấp của dê kháng chuột liên hợp IRDye 800CW được pha loãng 1:20.000 trong dung dịch đệm phong bế. Sau khi ủ các giấy lọc trong dung dịch kháng thể thứ cấp trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng, các giấy lọc được rửa và được chụp ảnh trên máy chụp ảnh hồng ngoại Odyssey CLx (Licor).

k. Quy trình thử nghiệm tạo sợi TTR

Dung dịch chứa 3,6 µM (0,2mg/ml) TTR-Y78F trong 50mM natri axetat, độ pH=4,8 được ủ ở 37°C trong 72 giờ khi có mặt 1,4 µM (0,2mg/ml) kháng thể TTR-lỗi hoặc đối chứng isotyp. Sau khi ủ, lượng dư 5X mol của thioflavin-T được bổ sung vào hỗn hợp này và để cho liên kết trong 30 phút. Các phép đo huỳnh quang được đo ở bước sóng phát xạ là 480nm với tập hợp bước sóng kích thích ở 440nm. Điểm ức chế 0% được đặt là cường độ huỳnh quang khi có mặt kháng thể đối chứng isotyp (83 a.u.) và điểm ức chế 100% được đặt là cường độ huỳnh quang khi không có mặt protein TTR-Y78F (38 a.u.).

Dung dịch gốc chứa TTR-V122I (xấp xỉ 5 mg/mL) được pha loãng vào dung dịch đệm với các nồng độ cuối cùng là 0,2 mg/mL TTR, 30 mM natri axetat, 5 mM natri phosphat, 100 mM KCl, 1 mM EDTA, 0,02% natri azit, và các nồng độ khác nhau của kháng thể đơn dòng ở độ pH=7,2. Mẫu này được thẩm tách ra khỏi cùng một dung dịch đệm ở độ pH=4,5 trong 3 giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó các mẫu được ủ ở 37°C trong 72 giờ. Sau khi ủ, lượng dư 5X mol của thioflavin-T được bổ sung vào hỗn hợp này và cho phép liên kết trong 30 phút. Sự phát huỳnh quang thioflavin-T được theo dõi bằng cách sử dụng máy đo phổ huỳnh quang Photon Technology International C60. Độ lợi bộ nhân quang được thay đổi và độ rộng khe kích thích và phát xạ được đặt ở 2-4 nm để tối đa hóa tỉ số tín hiệu cực đại trên nhiễu. Các phép đo sự phát huỳnh quang được thực hiện bằng cách sử dụng 430 nm và 480 nm lần lượt làm bước sóng kích thích và phát xạ.

l. Các mẫu mô tim

Các khối được làm đông lạnh tươi và được xử lý bằng parafin của mô tim có chẩn đoán xác định là có các đột biến ATTR thu được từ Bác sỹ Merrill Benson ở trường Đại học Indiana. Các mẫu bao gồm tám mẫu đông lạnh tươi và sáu mẫu FFPE và mỗi mẫu được chẩn đoán có ATTR hoặc một số chứng thoái hóa dạng tinh bột ở tim khác. Chẩn đoán của mô này được xác nhận thêm ở Prothena bằng cách nhuộm IHC bằng các kháng thể cho

chuỗi nhẹ kapa và lambđa và dạng tinh bột A trước khi mô tả đặc tính bằng các kháng thể TTR.

m. Hóa học mô miễn dịch

Hóa học mô miễn dịch được thực hiện trên các phần đông lạnh được đưa lên phiến kính 10µm được cố định nhẹ bằng paraformaldehyt và trên các phần parafin 5 µm. Phương pháp peroxidaza miễn dịch là hệ phát hiện chính, được thực hiện trên Leica Bond Rx (Leica Biosystems, Buffalo Grove, IL) bằng cách sử dụng Kit phát hiện tinh chế polyme liên kết (DS980, Leica Biosystems). Các kháng thể sơ cấp được ủ trong một giờ (theo các nồng độ trong bảng 2) sau đó ủ bằng các thể liên hợp kháng thể HRP-cầu nối polyme kháng chuột và kháng thỏ. Sự nhuộm màu được quan sát thấy với nhóm sinh màu DAB, mà tạo ra lắng đọng màu nâu. Các phiến kính được nhuộm tương phản bằng hematoxylin, được khử nước bằng một loạt rượu có nồng độ tăng dần, được làm sạch bằng xylen, và được đậy bằng CytoSeal 60 (Richard Allen Scientific; Kalamazoo, MI). Đối chứng âm bao gồm thực hiện toàn bộ quy trình hóa học mô miễn dịch trên các phần liền kề với đối chứng isotyp IgG không miễn dịch hoặc loại bỏ kháng thể sơ cấp.

n. Chứng minh dạng tinh bột: nhuộm bằng đỏ Congo và Thioflavin T

Việc nhuộm đỏ Congo được thực hiện để chứng minh dạng tinh bột TTR có trong mô này bằng cách sử dụng kit của American MasterTech (Lodi, California). Việc nhuộm này được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất. Các phiến kính được nhuộm trong dung dịch đỏ Congo trong 1 giờ sau đó biệt hóa trong 1% natri hydroxit trong xấp xỉ 15 giây. Sau đó các phiến kính được rửa dưới nước chảy, được khử nước bằng một loạt rượu có nồng độ tăng dần, và được làm sạch bằng ba lần thay xylen, và được đậy bằng CytoSeal 60.

Quy trình nhuộm Thioflavin T cải biến (Schmidt và đồng tác giả 1995.) được sử dụng để xác định sự có mặt của dạng tinh bột TTR trong mô này. Nói ngắn gọn, các phiến kính được nhuộm tương phản bằng hematoxylin Mayer, rửa dưới nước chảy và được nhuộm bằng dung dịch đã lọc chứa 0,015% Thioflavin T (T3516-25G; Sigma-Aldrich, St. Louis, MO) trong 50% etanol trong mười phút. Sau đó các phiến kính được rửa dưới nước chảy và được biệt hóa trong 1% (v/v) axit axetic trong 10 phút và rửa ba lần trong nước. Các phiến kính được để khô trong không khí trước khi được đậy bằng ProLong Gold (Life Technologies).

o. Phân tích hình ảnh

Các phiến kính được chụp ảnh bằng kính hiển vi Olympus BX61, máy quét tiêu bản kỹ thuật số Hamamatsu Nanozoomer 2.0HT, hoặc hệ đồng tiêu phổ Leica SPE. Các hình ảnh được thu lại và lưu trữ dưới dạng file TIFF.

p. Phân tích mẫu huyết tương người bằng SDS-PAGE/Thẩm tách Western

Sáu mẫu huyết tương của người bệnh đã được xác nhận V30M ATTR (mẫu #21, #22, #23, #24, #25, #27) và 6 mẫu (#11, #12, #15, #18, #19, #20) của các đối tượng bình thường thu được từ M. Saraiva (Đại học Porto, Bồ Đào Nha). Mẫu #C6 là mẫu huyết thanh người bình thường thu được từ nguồn thương mại (BioreclamationIVT). Các mẫu huyết tương này được tách bằng SDS-PAGE và được thẩm tách Western với 9D5 hoặc 5A1 như sau. 1,4 µL thể tích huyết tương được pha loãng 1:8 vào dung dịch đệm mẫu 1xLDS khi không có mặt chất khử (Life Technologies). Các mẫu được tách SDS-PAGE và được thẩm tách Western với 0,5 µg/mL 9D5 hoặc 5A1 như được mô tả trước đây.

q. Phân tích mẫu huyết tương người bằng thử nghiệm đĩa MesoScale Discovery (MSD)

Các đĩa MSD 96 lỗ được phủ bằng kháng thể đơn dòng 6C1 ở nồng độ 4 µg/mL trong PBS và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng kèm theo lắc, hoặc qua đêm ở 4°C. Các đĩa được rửa ba lần bằng 1xTBST trước khi được phong bế bằng dung dịch A phong bế MSD 3%, 150 µL mỗi lỗ trong khi lắc 1 giờ. Thể tích 30 µL mỗi lỗ của mẫu huyết tương người đã pha loãng 1:10 trong dung dịch đệm mẫu chứa 0,6% albumin huyết thanh bò không chứa globulin, 1,5 mM natri phosphat monobazơ, 8mM natri phosphat đibazơ, 145 mM natri clorua, 0,05% Triton X-405, và 0,05% thimerosal được bổ sung vào các đĩa MSD đã phong bế trong 1 giờ. Các đĩa được rửa 3 lần bằng 1xTBST. Thể tích 50 µL mỗi lỗ của 1 µg/mL kháng thể phát hiện được đánh dấu sulfo (toàn bộ kháng thể TTR 8C3 của kháng thể đa dòng Dako) trong dung dịch đệm mẫu được bổ sung vào trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng kèm theo lắc. Các đĩa được rửa ba lần bằng 1xTBST sau đó bổ sung 150 µL mỗi lỗ dung dịch 1X Đệm đọc T (Meso Scale Discovery). Các đĩa sau đó được đọc trong máy chụp ảnh MSD Sector.

r. Tạo đường cong chuẩn MSD

Để định lượng protein TTR phản ứng với 6C1 không tự nhiên, có mặt trong mẫu huyết tương người, đường cong chuẩn MSD được tạo ra bằng cách sử dụng TTR-

F87M/L110M tái tổ hợp làm chuẩn TTR phản ứng với 6C1. Biến thể TTR này chứa hai đột biến thế axit amin mà ngăn cản sự tạo tetrame và giữ protein này ở trạng thái monome (Jiang và đồng tác giả (2001) Biochemistry 40, 11442-11452). Như vậy, biến thể TTR này được nhận biết bởi tất cả các mAb TTR-lỗi và do đó là thích hợp để sử dụng làm chuẩn tham chiếu trong thử nghiệm MSD.

Để tạo ra đường cong chuẩn, các đĩa MSD 96 lỗ được phủ bằng kháng thể TTR-lỗi 6C1 ở nồng độ 4 µg/mL trong PBS và được ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ phòng kèm theo khuấy, hoặc qua đêm ở 4°C. Các đĩa được rửa ba lần bằng 1xTBST trước khi được phong bế bằng dung dịch A phong bế MSD 3%, 150 µL mỗi lỗ trong khi lắc 1 giờ. Sau đó các đĩa đã phong bế được xử lý trong 1 giờ bằng 50 µL mỗi lỗ của 25 µg/mL TTR-F87M/L110M được pha loãng thành dãy 1:5 với dung dịch pha loãng cuối cùng là dung dịch đệm hoàn toàn. Các đĩa được rửa 3 lần bằng 1xTBST trước khi bổ sung thể tích 50 µL mỗi lỗ 1µg/mL kháng thể phát hiện được đánh dấu sulfo (8C3-nhãn sulfo hoặc Dako pAb-nhãn sulfo) trong 1 giờ ở nhiệt độ phòng kèm theo lắc. Cả kháng thể 8C3 mAb và Dako đều được tạo cặp với nhãn sulfo và có thể được sử dụng làm kháng thể phát hiện vì chúng liên kết với toàn bộ TTR và không đặc hiệu về cấu hình.

Sau khi xử lý bằng kháng thể phát hiện, các đĩa được rửa ba lần bằng thể tích 150 µL mỗi lỗ của 1xTBST, sau đó bổ sung 150 µL mỗi lỗ 1x đệm đọc T (MSD). Các đĩa được đọc trong máy chụp ảnh MSD Sector và đường cong định cỡ TTR F87M/L110M tạo thành được tạo ra.

s. Thử nghiệm thực bào

1-mg/mL mẫu chứa TTR-F87M/L110M, TTR tự nhiên hoặc TTR-V30M kết tụ ở độ pH thấp được tạo cặp amin với thuốc nhuộm pHrodo trong 15 phút ở 37°C với tỉ lệ protein:thuốc nhuộm là ~15:4 theo hướng dẫn của nhà sản xuất (Thermo Scientific). Lượng dư nhãn pHrodo được loại bỏ bằng cách lọc áp lực trong máy cô đặc quay với điểm ngừng khối lượng phân tử 10K (Pierce Thermo) và pHrodo-TTR được tạo huyền phù lại trong 1x PBS.

Các bạch cầu đơn nhân người THP-1 được nuôi cấy trong môi trường nuôi cấy tế bào (RMPI, 10% huyết thanh IgG thấp, pen/strep). Phần phân ước 20-µg/mL của TTR được đánh dấu pHrodo được ủ sơ bộ riêng với 40 µg/mL kháng thể ở 37°C trong môi trường nuôi cấy tế bào trong 30 phút trước khi bổ sung thêm tế bào 5E+04 THP-1 theo tỉ

lệ thể tích 1:1. Sau khi ủ nuôi cấy mô (3 giờ), tế bào được rửa bằng môi trường nuôi cấy tế bào ba lần, được ủ trong môi trường trong 10 phút, sau đó được rửa hai lần bằng và được tạo huyền phù lại trong dung dịch đệm FACS (1% FBS trong PBS). Cường độ phát huỳnh quang đỏ pHrodo được phát hiện bằng cách sử dụng các bộ lọc kênh Đỏ Texas. Việc sử dụng kính hiển vi huỳnh quang (epifluorescence) được thực hiện theo kiểu tương tự. Sau khi phân tích FACS, tế bào còn lại được chuyển vào các phiến kính có ngăn bằng thủy tinh và được chụp bằng cách sử dụng kính hiển vi soi ngược. Các cường độ huỳnh quang trung bình được tính toán tự động bằng cách tính trung bình các cường độ huỳnh quang tương đối của từng tế bào đơn lẻ.

Ví dụ 12. Sự hấp thu TTR phụ thuộc kháng thể bởi tế bào THP-1

TTR-F87M/L110M được đánh dấu đồng hóa trị bằng pHrodo nhuộm huỳnh quang nhạy với độ pH. Nhãn pHrodo có sự phát huỳnh quang nhỏ nhất ở độ pH sinh lý, nhưng sự phát huỳnh quang được tăng cường khi bị ngập trong môi trường có độ pH thấp của các túi nhập bào và do đó chỉ thị sự hấp thu vào tế bào của các hạt đã đánh dấu. Các bạch cầu đơn nhân THP-1 được bổ sung vào TTR được đánh dấu pHrodo (TTR-F87M/L110M tự nhiên hoặc không tự nhiên) sau khi xử lý bằng kháng thể 14G8 hoặc kháng thể đối chứng isotyp. Các mức phát huỳnh quang thấp được quan sát thấy với kháng thể được ủ với TTR tự nhiên, và sau khi ủ kháng thể đối chứng với TTR không tự nhiên. Tuy nhiên sự phát huỳnh quang được tăng cường sau khi ủ 14G8 với TTR không tự nhiên (Fig.7A), gợi ý là TTR không tự nhiên không bị thực bào hiệu quả trong các điều kiện cơ bản, tuy nhiên, việc bổ sung các kháng thể TTR-lỗi gây ra sự thực bào TTR không tự nhiên một cách rõ ràng.

Sự thực bào phụ thuộc liều của các hạt TTR dạng sợi kết tụ lớn, được đánh dấu pHrodo cũng được chứng minh cho mỗi mAb TTR-lỗi (Fig.7B). Sự hấp thu phụ thuộc kháng thể tối đa thay đổi đối với mỗi mAb TTR-lỗi (6C1>9D5≈ 14G8> 5A1), đạt tới trạng thái ổn định ở các nồng độ mAb nằm trong khoảng 5-10 µg/mL. Hiệu lực kháng thể thay đổi có thể phản ánh các khác biệt về isotyp và các thay đổi kèm theo về chức năng hiệu ứng giữa bốn mAb TTR-lỗi. Các đối chứng, bao gồm tế bào chưa được xử lý

hoặc đã được xử lý bằng đối chứng isotyp IgG1, không thể hiện sự phát huỳnh quang phát hiện được hoặc được tăng cường, tương ứng.

Ví dụ 13. Đánh giá các kháng thể TTR-lỗi trong mô hình chuột chuyển gen

Các thử nghiệm *in vivo* được thực hiện trong mô hình chuột chuyển gen được làm tương thích với người V30M hTTR (Inoue và đồng tác giả, (2008) Specific pathogen free conditions prevent transthyretin amyloidosis in mouse models. Transgenic Research 17:817-826) để đánh giá hiệu lực của các kháng thể kháng TTR trong việc liên kết và loại bỏ hTTR đã kết tụ.

Các chuột chuyển gen được nuôi sử dụng quy trình chuẩn và mức nồng độ hTTR tuần hoàn của chúng được đánh giá bằng ELISA. Chuột có nồng độ huyết thanh là 200-400 μg/mL hTTR được sử dụng cho các nghiên cứu về hiệu lực tiếp theo. Tập hợp nghiên cứu thứ nhất kiểm tra sự lắng đọng tự nhiên của hTTR ở chuột chuyển gen. Việc phát hiện các lắng đọng hTTR bắt đầu ở 12 tháng tuổi và được lặp lại mỗi 3-6 tháng sau đó. Khi mức nồng độ chấp nhận được của các kết tụ được thấy ở chuột chuyển gen, các nghiên cứu về hiệu lực được bắt đầu. Các động vật được chia thành ba nhóm điều trị (n=10/ nhóm) và được điều trị hàng tuần trong bốn tuần bằng liều IP của tá dược lỏng, kháng thể đối chứng (đối chứng isotyp, 10 mpk) hoặc kháng thể kháng hTRR (10 mpk). Một tuần sau lần điều trị cuối cùng, chuột được gây chết không đau, các mô được thu gom và được xử lý, và sau đó được nhuộm để đánh giá số lượng và kích thước của các lắng đọng TTR còn lại. Các phương pháp định lượng và thống kê được sử dụng để xác định mức độ thanh thải quan sát được giữa các nhóm.

Trong một phương pháp khác, các kết tụ hTTR được tạo ra *in vitro* và sau đó được tiêm vào thận của chuột chuyển gen để gieo lắng đọng các kết tụ mới. Tác giả sáng chế đã xác định được là việc tiêm các chế phẩm này có thể thúc đẩy sự lắng đọng của các kết tụ mới theo kiểu có thể dự đoán được. Dựa vào các phát hiện này, các động vật được gây mê, thận trái được bộc lộ và nguyên liệu hTTR đã kết tụ trước được tiêm vào vỏ của thận. Sau khoảng thời gian phục hồi thích hợp, chuột được chia thành ba nhóm điều trị (n=10/ nhóm) và được điều trị hàng tuần trong từ bốn-tám tuần bằng liều IP của tá dược lỏng, kháng thể đối chứng (đối chứng isotyp, 10 mpk) hoặc kháng thể kháng hTRR (10 mpk). Một tuần sau lần điều trị cuối cùng, chuột được gây chết không đau, các thận được thu gom và được xử lý, và sau đó được nhuộm để đánh giá số lượng và kích thước của các lắng đọng TTR. Các

phương pháp định lượng và thống kê được sử dụng để xác định mức độ thay đổi được quan sát thấy giữa các nhóm.

Ví dụ 14. Đánh giá các kháng thể TTR-lỗi trong Mô hình cấy Matrigel

Tác giả sáng chế đã xác định được là hTTR đã kết tụ trước có thể được tạo huyền phù trong Matrigel (BD Bioscience, Cat #354263), được để cho hóa rắn và sau đó được đưa vào dưới da của chuột. Bốn tuần sau khi cấy, mô cấy Matrigel vẫn giữ được cấu trúc của nó và hTTR đã kết tụ vẫn có mặt trong mô cấy này. Ngoài ra, mô cấy này được dung nạp tốt bởi chuột và các kháng thể kháng hTTR có thể thấm vào và liên kết với các kết tụ được tạo huyền phù trong Matrigel. Dựa vào các phát hiện này, nghiên cứu về hiệu lực kháng thể được thực hiện. Các động vật được gây mê và mô cấy chứa hTTR đã kết tụ trước được tạo huyền phù trong Matrigel được đưa vào dưới da chuột. Sau khoảng thời gian phục hồi thích hợp, chuột được chia thành ba nhóm điều trị (n=10/nhóm) và được điều trị hàng tuần, trong từ hai-bốn tuần bằng liều IP của tá dược lỏng, kháng thể đối chứng (đối chứng isotyp, 10 mpk) hoặc kháng thể kháng hTRR (10 mpk). Sau lần điều trị cuối cùng, chuột được gây chết không đau, da chứa mô cấy được thu gom và được xử lý, và sau đó lượng các lắng đọng TTR còn lại được đánh giá bằng cách sử dụng các phương pháp mô học và/ hoặc hóa sinh. Phân tích định lượng và thống kê được sử dụng để xác định mức độ thanh thải được quan sát thấy giữa các nhóm.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể liên kết với transthyretin chứa vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành bao gồm ba CDR chuỗi nặng Kabat, CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 68 hoặc SEQ ID NO: 14, và CDR-H3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 69 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành bao gồm ba CDR chuỗi nhẹ Kabat, CDR-Ll có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77 hoặc SEQ ID NO: 80, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78, và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79.

2. Kháng thể theo điểm 1 chứa

(a) CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 68, và CDR-H3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 69, và CDR-Ll có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 77, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78, và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79; hoặc

(b) CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 13, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 14, và CDR-H3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 15, và CDR-Ll có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 24, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 25, và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 26; hoặc

(c) CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 68, và CDR-H3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 69, và CDR-Ll có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78, và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79.

3. Kháng thể theo điểm 2, chứa CDR-H1 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 67, CDR-H2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 68, và CDR-H3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 69, và CDR-Ll có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 80, CDR-L2 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 78, và CDR-L3 có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 79;

4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó CDR-H1 là CDR tổ hợp Kabat-Chothia có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 118.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này là kháng thể khảm, được làm tương thích với người, hoặc được ngụy trang.

7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể này có isotyp IgG1 của người, isotyp IgG2 của người hoặc isotyp IgG4 của người.

8. Kháng thể theo điểm 6, trong đó kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23, ngoại trừ vị trí H19 có thể là R hoặc K, vị trí H40 có thể là là A hoặc T, vị trí H44 có thể là là G hoặc R, vị trí H49 có thể là S hoặc A, vị trí H77 có thể là S hoặc T, vị trí H82a có thể là N hoặc S, vị trí H83 có thể là R hoặc K, vị trí H84 có thể là A hoặc S, và vị trí H89 có thể là V hoặc M.

9. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 8,

trong đó các vị trí H47, H69, và H82 lần lượt bị chiếm bởi L, F và S; hoặc

trong đó các vị trí H47, H69, H82 và H82b lần lượt bị chiếm bởi L, F, S và L; hoặc

trong đó các vị trí H42, H47, và H108 lần lượt bị chiếm bởi E, L và L; hoặc

trong đó các vị trí H69, H82, và H82b lần lượt bị chiếm bởi F, S và L; hoặc

trong đó các vị trí H47, và H108, mỗi vị trí bị chiếm bởi L; hoặc trong đó các vị trí H82 và H82b lần lượt bị chiếm bởi S và L; hoặc

trong đó các vị trí H42, H47, và H82b lần lượt bị chiếm bởi E, L và L; hoặc

trong đó vị trí L36 bị chiếm bởi F; hoặc

trong đó vị trí L60 bị chiếm bởi S; hoặc

trong đó các vị trí L8, L9, L19, L36, L39, L60, L70 và L74 lần lượt bị chiếm bởi A, P, V, F, R, S, A và R; hoặc

trong đó các vị trí L8, L9, L18, L19, L36, L39, L60, L70 và L74 lần lượt bị chiếm bởi A, P, S, V, F, R, S, A và R.

10. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 8, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 5 đến SEQ ID NO: 12 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự

axit amin là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 19 đến SEQ ID NO: 23.

11. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 10, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 11 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 19.

12. Kháng thể theo điểm 6, trong đó 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 có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được làm tương thích với người có trình tự axit amin tương đồng ít nhất là 90% với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76, ngoại trừ vị trí H82a có thể là N hoặc S, vị trí H83 có thể là R hoặc K, vị trí H84 có thể là A hoặc S, vị trí H89 có thể là V hoặc M, và vị trí L18 có thể là S hoặc P.

13. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 12,

trong đó các vị trí H1 và H47 lần lượt bị chiếm bởi E và L; hoặc trong đó vị trí L36 bị chiếm bởi F; hoặc

trong đó các vị trí H3 và H105 lần lượt bị chiếm bởi K và T; hoặc

trong đó các vị trí L8, L9, L19 và L70 lần lượt bị chiếm bởi A, P, V và A; hoặc

trong đó các vị trí L26 và L60, mỗi vị trí bị chiếm bởi S.

14. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 12, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 64 đến SEQ ID NO: 66, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin là trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 74 đến SEQ ID NO: 76, trong đó R ở vị trí L107 là tùy ý.

15. Kháng thể được làm tương thích với người theo điểm 14, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 65 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 76.

16. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó kháng thể này là kháng thể nguyên vẹn.

17. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 15, trong đó kháng thể này là đoạn liên kết.

18. Kháng thể theo điểm 17, trong đó đoạn liên kết này là kháng thể chuỗi đơn, đoạn Fab, hoặc $F(ab')_2$.

19. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong các điểm từ 1 đến 18, 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.

20. Kháng thể theo điểm 19, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nặng có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 103 có hoặc không có lysin ở đầu cùng C và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành được dung hợp với vùng hằng định chuỗi nhẹ có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 104 hoặc SEQ ID NO: 105.

21. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20 và chất mang dược dụng.

22. Axit nucleic hoặc các axit nucleic phân lập mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 20.

23. Axit nucleic hoặc các axit nucleic phân lập theo điểm 22 có trình tự bao gồm trình tự bất kỳ trong số các trình tự nêu trong SEQ ID NO: 40, SEQ ID NO: 42, SEQ ID NO: 44 đến SEQ ID NO: 56, SEQ ID NO: 87, SEQ ID NO: 89, SEQ ID NO: 91 đến SEQ ID NO: 96, và SEQ ID NO: 106 đến SEQ ID NO: 108.

24. Vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa axit nucleic phân lập theo điểm 22 hoặc 23 hoặc vectơ biểu hiện tái tổ hợp chứa các axit nucleic phân lập theo điểm 22 hoặc 23.

25. Tế bào chủ được biến nạp (các) vectơ biểu hiện tái tổ hợp theo điểm 24.

26. Phương pháp làm cho kháng thể tương thích với người, 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 để giữ lại;

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

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

trong đó kháng thể chuột này khác biệt ở chỗ vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 1 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 16, hoặc khác biệt ở chỗ vùng biến đổi chuỗi nặng trưởng thành có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 61 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ trưởng thành có trình tự nêu trong SEQ ID NO: 70.

27. Phương pháp tạo ra kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể khảm, hoặc kháng thể được ngụy trang theo điểm 6, phương pháp này bao gồm:

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

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

28. 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 6, phương pháp này bao gồm:

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

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

(c) phân lập tế bào đơn lẻ từ tế bào đã chọn lọc; và

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

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> LIU, Yue
NIJJAR, Tarlochan
CHAKRABARTTY, Avijit

<120> Kháng thể liên kết với transthyretin, axit nucleic mã hóa kháng thể, vectơ, tế bào chủ, dược phẩm chứa kháng thể và phương pháp sản xuất kháng thể

<130> 057450/473373

<150> 62/109,002
<151> 28-01-2015

<150> 62/266,556
<151> 11-12-2015

<160> 118

<170> FastSEQ cho phiên bản Windows 4.0

<210> 1
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m9D5VH

<400> 1

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

<210> 2
<211> 123
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1SEQ_H

<400> 2
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Ala Arg Gln Thr Pro Glu Lys Lys Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Tyr Ile Ser Lys Gly Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Leu Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Gly Ala Met Phe Gly Asn Asp Phe Lys Tyr Pro Met Asp Arg
100 105 110
Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 3
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> BAC02114

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

<210> 4
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> AAX82494

<400> 4
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ala Thr Ile Ser Ser Gly Gly Ser Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg Leu Tyr Tyr Gly Tyr Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
Gly Thr Met Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv1

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

<210> 6
<211> 124
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv2

<400> 6
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 7
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv2b

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

<210> 8
<211> 124

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv3

<400> 8
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

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

<220>
<223> Hu9D5VHv3b

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

<210> 10

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

<220>
<223> Hu9D5VHv4

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

<210> 11
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv4b

<400> 11
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 12
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv5

<400> 12
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 9D5 CDRH1 - Kabat

<400> 13
Ser Tyr Thr Met Ser
1 5

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

<220>
<223> 9D5 CDRH2 - Kabat

<400> 14
Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

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

<220>
<223> 9D5 CDRH3 - Kabat

<400> 15
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 16
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m9D5VL

<400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110

<210> 17
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1MJU_L

<400> 17
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

<210> 18
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ABC66952

<400> 18

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

<210> 19
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv1

<400> 19

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

<210> 20
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv2

<400> 20

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

<210> 21
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv3

<400> 21

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

<210> 22
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv4

<400> 22
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 23
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv5

<400> 23
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

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

<220>
<223> 9D5 CDRL1 - Kabat

<400> 24
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 9D5 CDRL2 - Kabat

<400> 25
Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 26
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 9D5 CDRL3 - Kabat

<400> 26
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 27
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu9D5 H1

<400> 27
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 28
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu9D5 H2

<400> 28
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 29
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu9D5 H2b

<400> 29
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

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

<210> 30
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu9D5 H3

<400> 30

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

```
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
            100                 105                 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    130                 135                 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
    210                 215                 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
        355                 360                 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            420                 425                 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        435                 440                 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 31
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu9D5 H3b

<400> 31
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 32
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu9D5 H4

<400> 32
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
Ser Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Ser Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220

Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 33
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu9D5 H4b

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

```
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
            100                 105                 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    130                 135                 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
    210                 215                 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
        355                 360                 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            420                 425                 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        435                 440                 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 34
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu9D5 H5

<400> 34
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Asn Leu Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr

385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 35
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Hu9D5 L1

<400> 35
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala 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 His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 36
<211> 219
<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Hu9D5 L2

<400> 36
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala 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 His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 37
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Hu9D5 L3

<400> 37
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala 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 Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 38
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Hu9D5 L4

<400> 38
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

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

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Hu9D5 L5

<400> 39
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 40
<211> 429
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> m9D5VH với peptit tín hiệu

<400> 40
atggactttg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt cctgtgtgaa 60
gtgaagctgg tggagtctgg gggaggttta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc 120
tgtgcagcct ctggattcac tttcagtagc tataccatgt cttgggttcg ccagactcca 180
gaaaagaggc tggagttggt cgcagaaatt agtaatagtg gtgataccac ctactatcca 240
gacactgtaa agggccgatt caccttctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acattattac 360
tatggtggtg gctacggggg gtggttcttc gatgtctggg gcacagggac cacggtcacc 420
gtctcctcg 429

<210> 41
<211> 143
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m9D5VH với peptit tín hiệu

<400> 41
Met Asp Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1   5   10   15
Val Leu Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20   25   30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35   40   45
Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
    50   55   60
Glu Leu Val Ala Glu Ile Ser Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro
65   70   75   80
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Phe Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
                85   90   95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
            100   105   110
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp
        115   120   125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130   135   140

<210> 42
<211> 396
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m9D5VL với peptit tín hiệu

<400> 42
atgaggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agccattggg 60
gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctcctggaga gtcagtatcc 120
atctcctgca ggtctagtaa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 180

ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcaa ctcctgatat atcgggtgtc caaccttgcc 240
tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 300
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacattt agaatatccg 360
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaa 396

<210> 43
<211> 132
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m9D5VL với peptit tín hiệu

<400> 43
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
20 25 30
Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45
Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
50 55 60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala
65 70 75 80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
85 90 95
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110
Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
115 120 125
Leu Glu Leu Lys
130

<210> 44
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv1

<400> 44
gaggtgcagc tggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagct ggtggccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg cttcaccttc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagtcca actccctgaa ggccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccactac 300
tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaggg caccaccgtg 360
accgtgtcct ca 372

<210> 45
<211> 372

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv2

<400> 45
gaggtgcagc tggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagct ggtggccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg cttcaccttc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagtcca acctgctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccactac 300
tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaggg caccaccgtg 360
accgtgtcct ca 372

<210> 46
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv2b

<400> 46
gaggtgcaac tggtggagtc tggcggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60
tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaaacc 120
cccgagaaga ggctggagtt ggtggctgag attagtaata gcggcgatac cacctactat 180
cccgataccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240
ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300
tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360
accgtgtcct ca 372

<210> 47
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv3

<400> 47
gaggtgcagc tggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgtccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg cttcaccttc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagtcca acctgctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccactac 300
tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaggg caccaccgtg 360
accgtgtcct ca 372

<210> 48
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv3b

<400> 48
gaggtgcaac tggtggagtc tggcggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60
tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaaacc 120
cccgggaaga ggctggagtt ggtggctgag attagtaata gcggcgatac cacctactat 180
cccgataccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240
ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300
tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360
accgtgtcct ca 372

<210> 49
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv4

<400> 49
gaggtgcagc tggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgtcctgggt gcgccaggcc 120
cccggcaagg gcctggagtg ggtgtccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa ctccctgtac 240
ctgcagtcca acctgctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccactac 300
tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaggg caccaccgtg 360
accgtgtcct ca 372

<210> 50
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VHv4b

<400> 50
gaggtgcaac tggtggagtc tggcggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60
tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaagcc 120
cccgggaaga ggctggagtt ggtggctgag attagtaata gcggcgatac cacctactat 180
cccgataccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240
ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300
tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360
accgtgtcct ca 372

<210> 51
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Hu9D5VHv5

<400> 51
gaggtgcagc tggtggagtc cggcggcggc ctggtgcagc ccggcggctc cctgcgcctg 60
tcctgcgccg cctccggctt caccttctcc tcctacacca tgtcctgggt gcgccagacc 120
cccgagaagc gcctggagct ggtggccgag atctccaact ccggcgacac cacctactac 180
cccgacaccg tgaagggccg cttcaccatc tcccgcgaca acgccaagaa caccctgtac 240
ctgcagatga acctgctgcg cgccgaggac accgccgtgt actactgcgc ccgccactac 300
tactacggcg gcggctacgg cggctggttc ttcgacgtgt ggggccaagg caccaccgtg 360
accgtgtcct ca 372

<210> 52
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv1

<400> 52
gacatcgtga tgacccagtc ccccctgtcc ctgcccgtga cccccggcga gcccgcctcc 60
atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
ttcctgcaga agcccggcca gtcccccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc ccgaccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
ctgaccttcg gccagggcac caagctggag atcaaa 336

<210> 53
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv2

<400> 53
gacatcgtga tgacccagtc ccccctgtcc ctgcccgtga cccccggcga gcccgcctcc 60
atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
tacctgcaga agcccggcca gtcccccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc ccgaccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
ctgaccttcg gccagggcac caagctggag atcaaa 336

<210> 54
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv3

<400> 54
gacatcgtga tgacccagtc ccccctgtcc ctgcccgtga cccccggcga gcccgcctcc 60

atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
tacctgcaga agcccggcca gtcccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc cctcccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgacttcac cctgaagatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
ctgaccttcg gccagggcac caagctggag atcaaa 336

<210> 55
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv4

<400> 55
gacatcgtga tgacccagtc cgcccctcc ctgcccgtga cccccggcga gcccgtgtcc 60
atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
ttcctgcagc gccccggcca gtcccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc cctcccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgccttcac cctgcgcatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
ctgaccttcg gccaaggcac caagctggag atcaaa 336

<210> 56
<211> 336
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu9D5VLv5

<400> 56
gacatcgtga tgacccagtc cgcccctcc ctgcccgtga cccccggcga gtccgtgtcc 60
atctcctgcc gctcctccaa gtccctgctg cactccaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
ttcctgcagc gccccggcca gtcccccag ctgctgatct accgcgtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc cctcccgctt ctccggctcc ggctccggca ccgccttcac cctgcgcatc 240
tcccgcgtgg aggccgagga cgtgggcgtg tactactgca tgcagcacct ggagtacccc 300
ctgaccttcg gccaaggcac caagctggag atcaaa 336

<210> 57
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit tín hiệu 9D5VH

<400> 57
Met Asp Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1   5   10   15
Val Leu Cys

<210> 58
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit tín hiệu 9D5VH

<400> 58
atggactttg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt cctgtgt 57

<210> 59
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit tín hiệu 9D5VL

<400> 59
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ile Gly
20

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

<220>
<223> Peptit tín hiệu 9D5VL

<400> 60
atgaggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agccattggg 60

<210> 61
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m14G8VH

<400> 61
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

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

<210> 62
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 1MQK_H

<400> 62

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

<210> 63
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> AAD30410

<400> 63

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

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

<210> 64
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VHv1

<400> 64

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

<210> 65
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VHv2

<400> 65

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

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

<210> 66
<211> 124
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VHv3

<400> 66

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

<210> 67
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14G8 CDRH1 - Kabat

<400> 67

```
Ser Tyr Thr Met Ser
 1               5
```

<210> 68
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14G8 CDRH2 - Kabat

<400> 68
Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val Lys
1 5 10 15
Gly

<210> 69
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14G8 CDRH3 - Kabat

<400> 69
His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp Val
1 5 10 15

<210> 70
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m14G8VL

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

<210> 71
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> MJU_L

<400> 71
Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Met Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Arg Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Leu Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Phe Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
100 105 110
Arg

<210> 72
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ABA71374

<400> 72
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Arg His Tyr
20 25 30
Ser Gly Tyr Thr Tyr Ile Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Val Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala 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 Ala
85 90 95
Leu Gln Thr Val Cys Ser Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

Arg

<210> 73
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ABC66952

<400> 73
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Gln Ser Leu Leu Tyr Ser
20 25 30
Asn Gly Tyr Asn Tyr Leu Asp Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Ser Gly Ser Asn Arg Ala 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 Ala
85 90 95
Leu Gln Ser Pro Tyr Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg

<210> 74
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VLv1

<400> 74
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys

100 105 110

Arg

<210> 75
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VLv2

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

<210> 76
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VLv3

<400> 76
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala 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 Met Gln His
85 90 95

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

<210> 77
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14G8 CDRL1 (mouse, HuVLv1, HuVLv2) - Kabat

<400> 77
Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 78
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14G8 CDRL2 - Kabat

<400> 78
Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 79
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14G8 CDRL3 - Kabat

<400> 79
Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 80
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14G8 CDRL1 (HuVLv3) - Kabat

<400> 80
Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 81
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu14G8 H1

<400> 81
Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Thr Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
180 185 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
195 200 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
210 215 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225 230 235 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
245 250 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
260 265 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
275 280 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
290 295 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp

305 310 315 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
325 330 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
340 345 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
355 360 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
370 375 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385 390 395 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
405 410 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
420 425 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
435 440 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 82
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu14G8 H2

<400> 82
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30
Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45
Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro Asp Thr Val
50 55 60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80
Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
100 105 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
115 120 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
130 135 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145 150 155 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
165 170 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val

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

<210> 83
<211> 454
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng Hu14G8 H3

<400> 83

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

```
    50                  55                  60
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65                  70                  75                  80
Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85                  90                  95
Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp Phe Phe Asp
            100                 105                 110
Val Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys
        115                 120                 125
Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly
    130                 135                 140
Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro
145                 150                 155                 160
Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr
                165                 170                 175
Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
            180                 185                 190
Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn
        195                 200                 205
Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Arg Val Glu Pro
    210                 215                 220
Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu
225                 230                 235                 240
Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp
                245                 250                 255
Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp
            260                 265                 270
Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly
        275                 280                 285
Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn
    290                 295                 300
Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp
305                 310                 315                 320
Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro
                325                 330                 335
Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            340                 345                 350
Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn
        355                 360                 365
Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile
    370                 375                 380
Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr
385                 390                 395                 400
Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys
                405                 410                 415
Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
            420                 425                 430
Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu
        435                 440                 445
Ser Leu Ser Pro Gly Lys
    450
```

<210> 84
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Hu14G8 L1

<400> 84
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Ala Pro Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
35 40 45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala Ser Gly Val Pro
50 55 60
Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe Thr Leu Lys Ile
65 70 75 80
Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Met Gln His
85 90 95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
115 120 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 85
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Hu14G8 L2

<400> 85
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15
Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30
Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

```
        35                  40                  45
Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala 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 His
                85                  90                  95
Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
            100                 105                 110
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
        115                 120                 125
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
    130                 135                 140
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145                 150                 155                 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195                 200                 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 86
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ Hu14G8 L3

<400> 86

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

```
145                 150                 155                 160
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
                165                 170                 175
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
            180                 185                 190
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
        195                 200                 205
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
    210                 215
```

<210> 87
<211> 429
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo.

<220>
<223> m14G8VH với peptit tín hiệu

<400> 87
atgaatttcg ggctcagctt gattttcctt gtccttgttt taaaaggtgt cctgtgtgaa 60
gtgaagctgg tggagtctgg gggaggttta gtgcagcctg gagggtccct gaaactctcc 120
tgtgcagcct ccggattcac tttcagtagc tataccatgt cttgggttcg ccagactcca 180
gaaaagaggc tggagttggt cgcagaaatt aataatagtg gtgataccac ctactatcca 240
gacactgtaa agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg 300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacacg gccatgtatt actgtgcaag acattattac 360
tatggtggtg gctacggggg gtggttcttc gatgtctggg gcacagggac cacggtcacc 420
gtctcctca 429

<210> 88
<211> 143
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m14G8VH với peptit tín hiệu

<400> 88
```
Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
 1               5                  10                  15
Val Leu Cys Glu Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln
            20                  25                  30
Pro Gly Gly Ser Leu Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe
        35                  40                  45
Ser Ser Tyr Thr Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Lys Arg Leu
    50                  55                  60
Glu Leu Val Ala Glu Ile Asn Asn Ser Gly Asp Thr Thr Tyr Tyr Pro
65                  70                  75                  80
Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn
                85                  90                  95
Thr Leu Tyr Leu Gln Met Ser Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met
            100                 105                 110
Tyr Tyr Cys Ala Arg His Tyr Tyr Tyr Gly Gly Gly Tyr Gly Gly Trp
```

```
        115                 120                 125
Phe Phe Asp Val Trp Gly Thr Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
    130                 135                 140
```

<210> 89
<211> 399
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m14G8VL với peptit tín hiệu

<400> 89
atgaggtgcc tagctgagtt cctggggctg cttgtgctct ggatccctgg agccattggg 60
gatattgtga tgactcaggc tgcaccctct gtacctgtca ctcctggaga gtcagtatcc 120
atctcctgca ggtctaataa gagtctcctg catagtaatg gcaacactta cttgtattgg 180
ttcctgcaga ggccaggcca gtctcctcaa ctcctgatat atcgggtgtc caaccttgcc 240
tcaggagtcc cagacaggtt cagtggcagt gggtcaggaa ctgctttcac actgagaatc 300
agtagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt tattactgta tgcaacattt agaatatccg 360
ctcacgttcg gtgctgggac caagctggag ctgaaacgt 399

<210> 90
<211> 133
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> m14G8VL với peptit tín hiệu

<400> 90
```
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
 1               5                  10                  15
Gly Ala Ile Gly Asp Ile Val Met Thr Gln Ala Ala Pro Ser Val Pro
            20                  25                  30
Val Thr Pro Gly Glu Ser Val Ser Ile Ser Cys Arg Ser Asn Lys Ser
        35                  40                  45
Leu Leu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Tyr Trp Phe Leu Gln Arg
    50                  55                  60
Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Ala
65                  70                  75                  80
Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ala Phe
                85                  90                  95
Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
            100                 105                 110
Cys Met Gln His Leu Glu Tyr Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr Lys
        115                 120                 125
Leu Glu Leu Lys Arg
    130
```

<210> 91
<211> 372

<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VHv1

<400> 91
gaggtgaagc tggtggagtc tggcggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60
tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaaacc 120
cccgagaaga ggctggagtt ggtggctgag attaataata gcggcgatac cacctactat 180
cccgataccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240
ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300
tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggcaccgg caccctggtc 360
accgtgtcct ca 372

<210> 92
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VHv2

<400> 92
gaggtgcaac tggtggagtc tggcggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60
tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaaacc 120
cccgagaaga ggctggagtt ggtggctgag attaataata gcggcgatac cacctactat 180
cccgataccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240
ctgcaaatga gtagcctgaa gtctgaggat accgctatgt attattgtgc tagacattat 300
tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360
accgtgtcct ca 372

<210> 93
<211> 372
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VHv3

<400> 93
gaggtgcaac tggtggagtc tggcggcggc ttggtgcaac ctggcggctc cctgaagctg 60
tcctgtgccg cctccggctt caccttcagc agctatacca tgtcttgggt gcgccaaacc 120
cccgagaaga ggctggagtt ggtggctgag attaataata gcggcgatac cacctactat 180
cccgataccg tgaagggccg cttcaccatt tccagagata atgctaagaa taccctgtat 240
ctgcaaatga atagcctgag ggctgaggat accgctgtgt attattgtgc tagacattat 300
tattatggcg gcggctatgg cggctggttc ttcgatgtgt ggggccaagg caccctggtc 360
accgtgtcct ca 372

<210> 94
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VLv1

<400> 94
gatatcgtga tgacccagtc tgccccctcc ctgcctgtga cccctggcga gtccgtgtcc 60
atctcctgcc ggtccaacaa gagcctgctg cacagcaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
ttcctgcaaa agcccggcca atcccctcaa ctgctgatct accgggtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc ccgataggtt ctccggaagc ggctccggca ccgccttcac cctgaagatt 240
agtagagtcg aggccgagga tgtgggcgtg tactactgta tgcaacactt ggagtacccc 300
ctgacgttcg gccaaggcac caagctggag atcaagcgt 339

<210> 95
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VLv2

<400> 95
gatatcgtga tgacccagtc tcccctgtcc ctgcctgtga cccctggcga gcccgcctcc 60
atctcctgcc ggtccaacaa gagcctgctg cacagcaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
ttcctgcaaa agcccggcca atcccctcaa ctgctgatct accgggtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc ccgataggtt ctccggaagc ggctccggca ccgatttcac cctgaagatt 240
agtagagtcg aggccgagga tgtgggcgtg tactactgta tgcaacactt ggagtacccc 300
ctgacgttcg gccaaggcac caagctggag atcaagcgt 339

<210> 96
<211> 339
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Hu14G8VLv3

<400> 96
gatatcgtga tgacccagtc tcccctgtcc ctgcctgtga cccctggcga gcccgcctcc 60
atctcctgcc ggtccagcaa gagcctgctg cacagcaacg gcaacaccta cctgtactgg 120
ttcctgcaaa agcccggcca atcccctcaa ctgctgatct accgggtgtc caacctggcc 180
tccggcgtgc ccagtaggtt ctccggaagc ggctccggca ccgatttcac cctgaagatt 240
agtagagtcg aggccgagga tgtgggcgtg tactactgta tgcaacactt ggagtacccc 300
ctgacgttcg gccaaggcac caagctggag atcaagcgt 339

<210> 97
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit tín hiệu 14G8VH

<400> 97

Met Asn Phe Gly Leu Ser Leu Ile Phe Leu Val Leu Val Leu Lys Gly
1 5 10 15
Val Leu Cys

<210> 98
<211> 57
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit tín hiệu 14G8VH

<400> 98
atgaatttcg gcctgagctt gattttcctg gtgctggtgt tgaagggcgt gctgtgt 57

<210> 99
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit tín hiệu 14G8VL

<400> 99
Met Arg Cys Leu Ala Glu Phe Leu Gly Leu Leu Val Leu Trp Ile Pro
1 5 10 15
Gly Ala Ile Gly
20

<210> 100
<211> 60
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit tín hiệu 14G8VL

<400> 100
atgaggtgcc tggccgagtt cctgggcctg ctggtgctgt ggatccctgg cgccatcggc 60

<210> 101
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 người

<400> 101

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

<210> 102
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 người của alen IgG1 G1m3

<400> 102
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 103
<211> 330
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 người của alen IgG1 G1m3

<400> 103
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15
Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
20 25 30
Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45
Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60
Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80
Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95
Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110
Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
115 120 125
Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys
130 135 140
Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp
145 150 155 160
Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu
165 170 175
Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu
180 185 190
His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn
195 200 205
Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly
210 215 220
Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu
225 230 235 240
Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr
245 250 255
Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn
260 265 270
Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
275 280 285
Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn
290 295 300
Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr
305 310 315 320
Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
325 330

<210> 104
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa người

<400> 104
Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15
Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
20 25 30
Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
35 40 45
Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
50 55 60
Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
65 70 75 80
Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
85 90 95
Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
100 105

<210> 105
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa người

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

<210> 106
<211> 990
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng hằng định chuỗi nặng IgG1 người của alen IgG1
G1m3

<400> 106

gcctccacca agggtccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60
ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120
tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240
tacatctgca acgtgaatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagccc 300
aaatcttgtg acaaaactca cacatgccca ccgtgcccag cacctgaact cctgggggga 360
ccgtcagtct tcctcttccc cccaaaaccc aaggacaccc tcatgatctc ccggacccct 420
gaggtcacat gcgtggtggt ggacgtgagc cacgaagacc ctgaggtcaa gttcaactgg 480
tacgtggacg gcgtggaggt gcataatgcc aagacaaagc cgcgggagga gcagtacaac 540
agcacgtacc gtgtggtcag cgtcctcacc gtcctgcacc aggactggct gaatggcaag 600
gagtacaagt gcaaggtctc caacaaagcc ctcccagccc ccatcgagaa aaccatctcc 660
aaagccaaag ggcagccccg agaaccacag gtgtacaccc tgcccccatc ccgggaggag 720
atgaccaaga accaggtcag cctgacctgc ctggtcaaag gcttctatcc cagcgacatc 780
gccgtggagt gggagagcaa tgggcagccg gagaacaact acaagaccac gcctcccgtg 840
ctggactccg acggctcctt cttcctctat agcaagctca ccgtggacaa gagcaggtgg 900
cagcagggga acgtcttctc atgctccgtg atgcatgagg ctctgcacaa ccactacacg 960
cagaagagcc tctccctgtc cccgggtaaa 990

<210> 107
<211> 321
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa người

<400> 107
cgaactgtgg ctgcaccatc tgtcttcatc ttcccgccat ctgatgagca gttgaaatct 60
ggaactgcct ctgttgtgtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag 120
tggaaggtgg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac 180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag 240
aaacacaaag tctacgcctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag 300
agcttcaaca ggggagagtg t 321

<210> 108
<211> 318
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Vùng hằng định chuỗi nhẹ kappa người

<400> 108
actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60
actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120
aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180
aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240
cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300
ttcaacaggg gagagtgt 318

<210> 109
<211> 147
<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 109
Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
1 5 10 15
Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
20 25 30
Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
35 40 45
Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
50 55 60
Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
65 70 75 80
Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys
85 90 95
Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu
100 105 110
Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala
115 120 125
Ala Leu Leu Ser Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn
130 135 140
Pro Lys Glu
145

<210> 110
<211> 127
<212> PRT
<213> Người hiện đại

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

<210> 111
<211> 127
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 111
Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu Met Val Lys Val
1 5 10 15
Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val Ala Val His Val
20 25 30
Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe Ala Ser Gly Lys
35 40 45
Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr Glu Glu Gln Phe
50 55 60
Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys Ser Tyr Trp Lys
65 70 75 80
Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr
85 90 95
Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Thr Ile Ala Ala Leu Leu Ser
100 105 110
Pro Tyr Ser Tyr Ser Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
115 120 125

<210> 112
<211> 138
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 112
Met Ala Ser His Arg Leu Leu Leu Leu Cys Leu Ala Gly Leu Val Phe
1 5 10 15
Val Ser Glu Ala Gly Pro Thr Gly Thr Gly Glu Ser Lys Cys Pro Leu
20 25 30
Met Val Lys Val Leu Asp Ala Val Arg Gly Ser Pro Ala Ile Asn Val
35 40 45
Ala Val His Val Phe Arg Lys Ala Ala Asp Asp Thr Trp Glu Pro Phe
50 55 60
Ala Ser Gly Lys Thr Ser Glu Ser Gly Glu Leu His Gly Leu Thr Thr
65 70 75 80
Glu Glu Glu Phe Val Glu Gly Ile Tyr Lys Val Glu Ile Asp Thr Lys
85 90 95
Ser Tyr Trp Lys Ala Leu Gly Ile Ser Pro Phe His Glu His Ala Glu
100 105 110
Val Val Phe Thr Ala Asn Asp Ser Gly Pro Arg Arg Tyr Ser Tyr Ser
115 120 125
Thr Thr Ala Val Val Thr Asn Pro Lys Glu
130 135

<210> 113
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Các gốc transthyretin 89-97

<400> 113
Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala
1 5

<210> 114
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất gây miễn dịch transthyretin tiềm năng

<400> 114
Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Gly Gly Lys Gly
1 5 10 15

<210> 115
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất gây miễn dịch transthyretin tiềm năng

<400> 115
Cys Gly Gly Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala
1 5 10

<210> 116
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chất gây miễn dịch transthyretin tiềm năng

<400> 116
Glu His Ala Glu Val Val Phe Thr Ala Cys Gly Gly
1 5 10

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 9D5 CDRH1 - thể liên hợp Chothia-Kabat

<400> 117
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
1 5 10

<210> 118
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 14G8 CDRH1 - Thể liên hợp Chothia-Kabat

<400> 118
Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr Thr Met Ser
1 5 10

10 20 30 40
m9D5VH EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
Kháng thể mẫu của chuột 1SEQ_H EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSTYTMSWARQTPE 42
Kháng thể mẫu của chuột .MQK_H EVKLQESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
Kháng thể nhân của người BAC02114 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYEMNWVRQAPG 42
Kháng thể nhân của người AAX82494 QVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPD 42
Hu9D5VHv1 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPG 42
Hu9D5VHv2 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPG 42
Hu9D5VHv2b EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
Hu9D5VHv3 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPG 42
Hu9D5VHv3b EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPG 42
Hu9D5VHv4 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPG 42
Hu9D5VHv4b EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQAPG 42
Hu9D5VHv5 EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
50 60 70 80
m9D5VH KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRFTFSRDNAKNTLYLQMS 84
Kháng thể mẫu của chuột 1SEQ_H KKLEWVAYISKGGGSTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
Kháng thể mẫu của chuột .1MQK_H KRLEWVASINNGGGRTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
Kháng thể nhân của người BAC02114 KGLEWVSYITSSGSTIYYADSVKGRFTISRDNAKNSLYLQMN 84
Kháng thể nhân của người AAX82494 KRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
Hu9D5VHv1 KGLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRFTFSRDNAKNSLYLQSN 84
Hu9D5VHv2 KGLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRFTFSRDNAKNSLYLQSN 84
Hu9D5VHv2b KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
Hu9D5VHv3 KGLEWVSEISNSGDTTYYPDTVKGRFTFSRDNAKNSLYLQSN 84
Hu9D5VHv3b KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
Hu9D5VHv4 KGLEWVSEISNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNSLYLQSN 84
Hu9D5VHv4b KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
Hu9D5VHv5 KRLELVAEISNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMN 84

FIG. 1A.1

		90	100	110	120		
m9D5VH		SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGTGTTVTVSS				124	(SEQ ID NO.1)
Kháng thể mẫu của chuột	1SEQ_H	SLKSEDTALYYCAR-GAMFGNDFKYPMDRWGQGTSVTVSS				123	(SEQ ID NO.2)
Kháng thể mẫu của chuột	1MQK_H	SLKSEDTAMYYCVRHEYY-------YAMDYWGQGTTVTVSS				118	(SEQ ID NO.62)
Kháng thể nhận của người	BAC02114	SLRAEDTAVYYCARGGQGSRYYYYYYGMDVWGQGTTVTVSS				124	(SEQ ID NO.3)
Kháng thể nhận của người	AAX82494	SLKSEDTAMYYCARLYYGYRYYYF-----DYWGQGTMVTVSS				120	(SEQ ID NO.4)
Hu9D5VHv1		SLKAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTVTVSS				124	(SEQ ID NO.5)
Hu9D5VHv2		LLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTVTVSS				124	(SEQ ID NO.6)
Hu9D5VHv2b		SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTLVTVSS				124	(SEQ ID NO.7)
Hu9D5VHv3		LLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTVTVSS				124	(SEQ ID NO.8)
Hu9D5VHv3b		SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTLVTVSS				124	(SEQ ID NO.9)
Hu9D5VHv4		LLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTVTVSS				124	(SEQ ID NO.10)
Hu9D5VHv4b		SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTLVTVSS				124	(SEQ ID NO.11)
Hu9D5VHv5		LLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTTVTVSS				124	(SEQ ID NO.12)

FIG. 1A.2

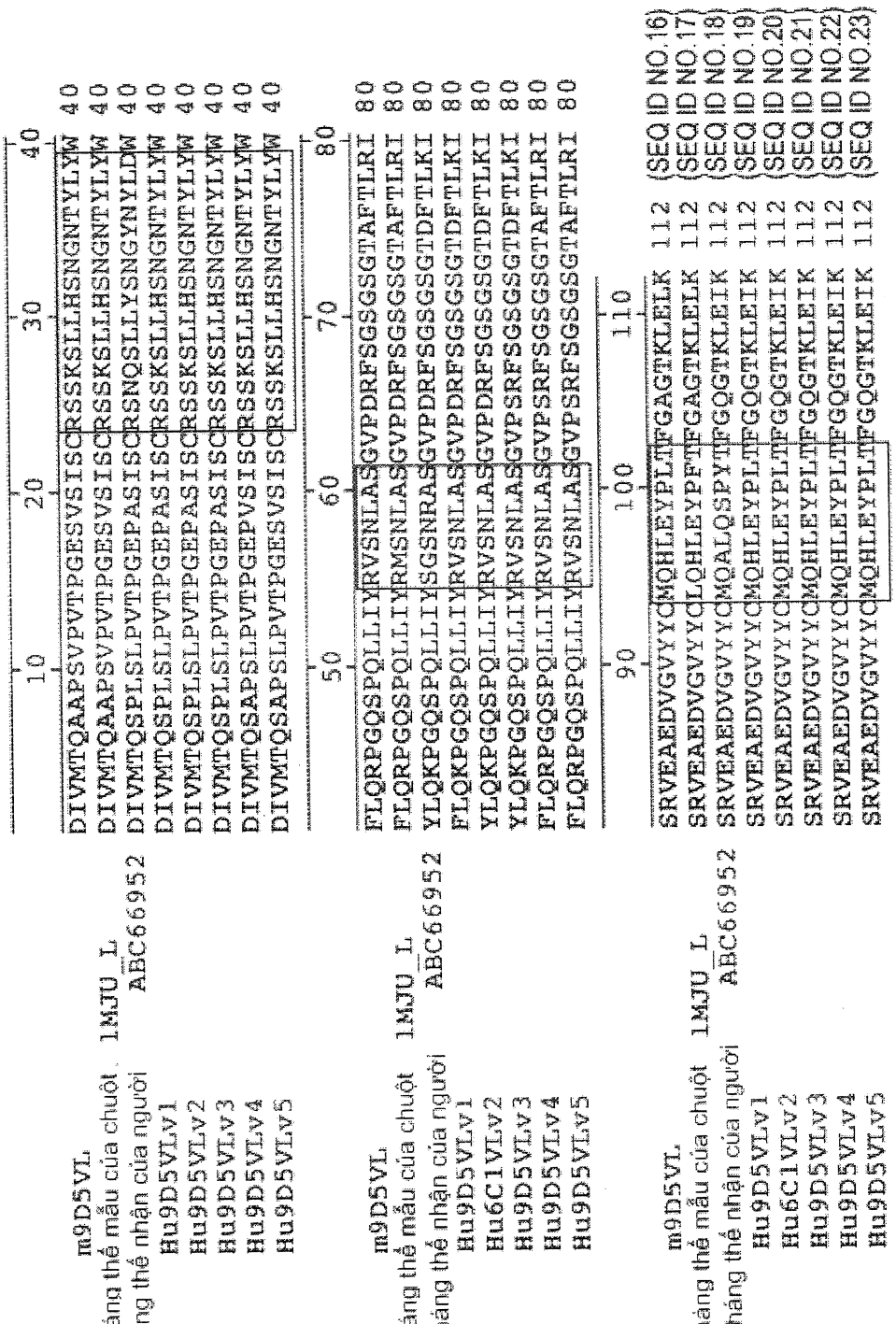

10 20 30 40
DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMTQAAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSNQSLLYSNGYNYLDW 40
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMTQSAPSLPVTPGEPVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMTQSAPSLPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
50 60 70 80
FLQRPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI 80
FLQRPGQSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI 80
YLQKPGQSPQLLIYSGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI 80
FLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI 80
YLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI 80
YLQKPGQSPQLLIYRVSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLKI 80
FLQRPGQSPQLLIYRVSNLASGVPSRFSGSGSGTAFTLRI 80
FLQRPGQSPQLLIYRVSNLASGVPSRFSGSGSGTAFTLRI 80
90 100 110
SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGAGTKLELK 112 (SEQ ID NO.16)
SRVEAEDVGVYYCLQHLEYPFTFGAGTKLELK 112 (SEQ ID NO.17)
SRVEAEDVGVYYCMQALQSPYTFGQGTKLEIK 112 (SEQ ID NO.18)
SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK 112 (SEQ ID NO.19)
SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK 112 (SEQ ID NO.20)
SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK 112 (SEQ ID NO.21)
SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK 112 (SEQ ID NO.22)
SRVEAEDVGVYYCMQHLEYPLTFGQGTKLEIK 112 (SEQ ID NO.23)
m9D5VL
Kháng thể mẫu của chuột 1MJU_L
Kháng thể nhận của người ABC66952
Hu9D5VLv1
Hu9D5VLv2
Hu9D5VLv3
Hu9D5VLv4
Hu9D5VLv5
m9D5VL
Kháng thể mẫu của chuột 1MJU_L
Kháng thể nhận của người ABC66952
Hu9D5VLv1
Hu6C1VLv2
Hu9D5VLv3
Hu9D5VLv4
Hu9D5VLv5
m9D5VL
Kháng thể mẫu của chuột 1MJU_L
Kháng thể nhận của người ABC66952
Hu9D5VLv1
Hu6C1VLv2
Hu9D5VLv3
Hu9D5VLv4
Hu9D5VLv5

FIG. 1B

m14G8VH
Kháng thể mẫu của chuột 1MQK_H
Kháng thể nhân của người AAD30410
Kháng thể nhận của người AAX82494
Hu14G8VHv1
Hu14G8VHv2
Hu14G8VHv3
EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
EVKLQESGGDLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
QVQLVQSGGGLVQPGGSRKLSCAASGFTFSSYAMSWVRQTPE 42
QVQLQESGGGLVKPGGSLKLSCAASGFTFSSYGMSWVRQTPD 42
EVKLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
EVQLVESGGGLVQPGGSLKLSCAASGFTFSSYTMSWVRQTPE 42
KRLELVAEINNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
KRLEWVASINNGGRTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
KRLEWVAAISTDGSFIYYADTVKGRFTISGDNSKNTLYLQMN 84
KRLEWVATISSGGSYTYYPDSVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
KRLELVAEINNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
KRLELVAEINNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMS 84
KRLELVAEINNSGDTTYYPDTVKGRFTISRDNAKNTLYLQMN 84
SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGTGTTVTVSS 124 (SEQ ID NO.61)
SLKSEDTAMYYCVRHEYY------YAMDYWGQGTTVTVSS 118 (SEQ ID NO.62)
SLRAEDTAVYYCAKDRGIDATAQVGRFDFWGQGTLVTVSS 124 (SEQ ID NO.63)
SLKSEDTAMYYCARLYYGYRYYYF-----DYWGQGTMVTVSS 120 (SEQ ID NO.4)
SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGTGTLVTVSS 124 (SEQ ID NO.64)
SLKSEDTAMYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTLVTVSS 124 (SEQ ID NO.65)
SLRAEDTAVYYCARHYYYGGGYGGWFFDVWGQGTLVTVSS 124 (SEQ ID NO.66)

FIG. 2A

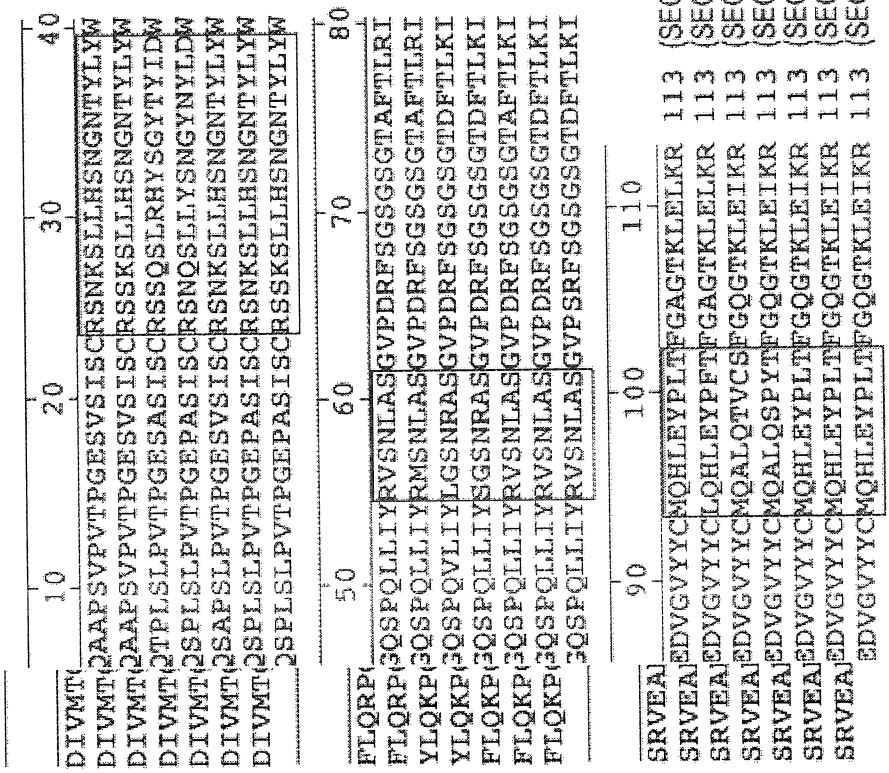

m14G8VL
Kháng thể mẫu của chuột 1MJU_L
Kháng thể nhận của người ABA71374
Kháng thể nhận của người ABC66952
Hu14G8VLv1
Hu14G8VLv2
Hu14G8VLv3
DIVMT(2AAPSVPVTPGESVSISCRSNKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMT(2AAPSVPVTPGESVSISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMT(2TPLSLPVTPGESASISCRSSQSLRHYSGYTYIDW 40
DIVMT(2SPLSLPVTPGEPASISCRSNQSLLYSNGYNYLDW 40
DIVMT(2SAPSLPVTPGESVSISCRSNKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMT(2SPLSLPVTPGEPASISCRSNKSLLHSNGNTYLYW 40
DIVMT(2SPLSLPVTPGEPASISCRSSKSLLHSNGNTYLYW 40
FLQRP(3QSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI 80
FLQRP(3QSPQLLIYRMSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLRI 80
YLQKP(3QSPQVLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI 80
YLQKP(3QSPQLLIYSGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI 80
FLQKP(3QSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTAFTLKI 80
FLQKP(3QSPQLLIYRVSNLASGVPDRFSGSGSGTDFTLKI 80
FLQKP(3QSPQLLIYRVSNLASGVPSRFSGSGSGTDFTLKI 80
SRVEA(4DVGVYYC(5QHLEYPLTFGAGTKLELKR 113 (SEQ ID NO.70)
SRVEA(4DVGVYYC(5QHLEYPFTFGAGTKLELKR 113 (SEQ ID NO.71)
SRVEA(4DVGVYYC(5QALQTVCSFGQGTKLEIKR 113 (SEQ ID NO.72)
SRVEA(4DVGVYYC(5QALQSPYTFGQGTKLEIKR 113 (SEQ ID NO.73)
SRVEA(4DVGVYYC(5QHLEYPLTFGQGTKLEIKR 113 (SEQ ID NO.74)
SRVEA(4DVGVYYC(5QHLEYPLTFGQGTKLEIKR 113 (SEQ ID NO.75)
SRVEA(4DVGVYYC(5QHLEYPLTFGQGTKLEIKR 113 (SEQ ID NO.76)

FIG. 2B

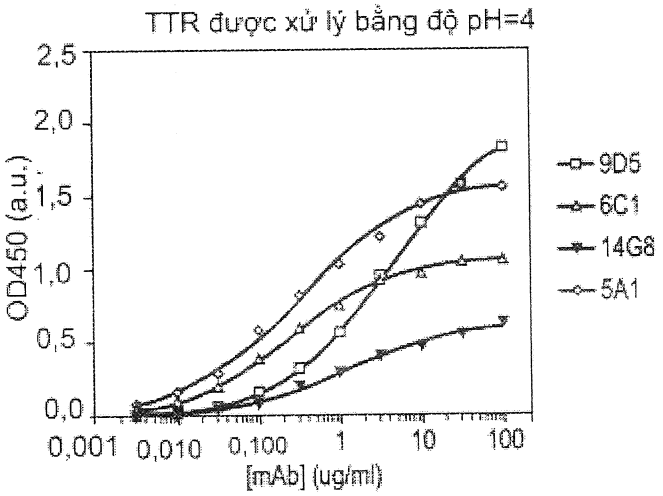

TTR được xử lý bằng độ pH=4
OD450 (a.u.)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,010
0,100
1
10
100
[mAb] (ug/ml)
9D5
6C1
14G8
5A1

FIG. 3A

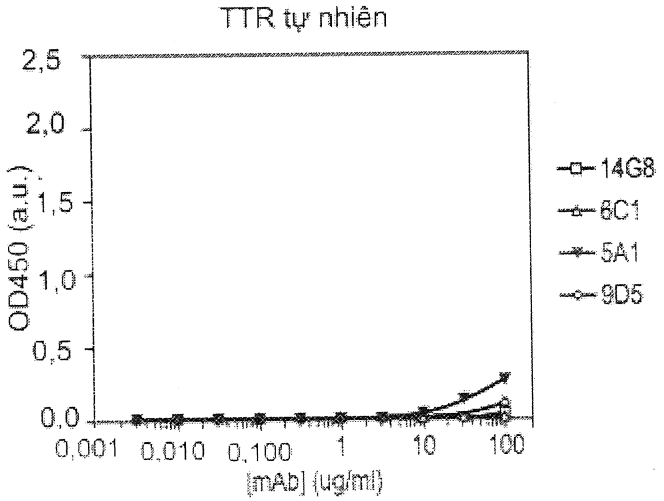

TTR tự nhiên
OD450 (a.u.)
2,5
2,0
1,5
1,0
0,5
0,0
0,001
0,010
0,100
1
10
100
[mAb] (ug/ml)
14G8
6C1
5A1
9D5

FIG. 3B

7/8

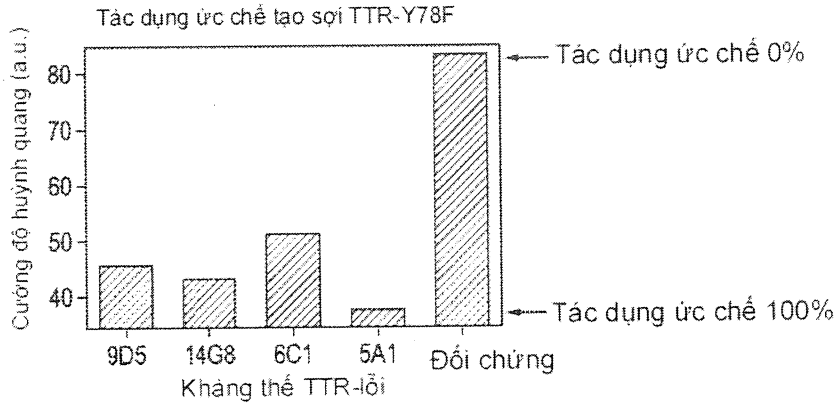


FIG. 4A

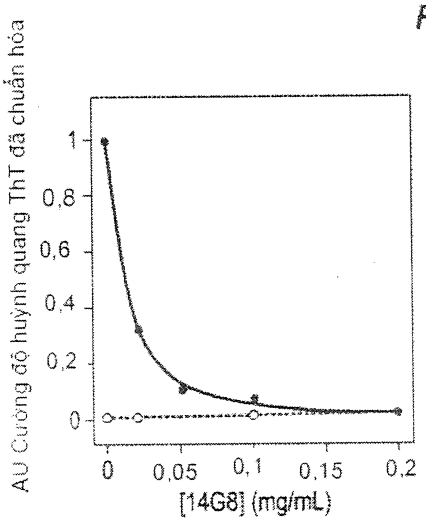


FIG. 4B

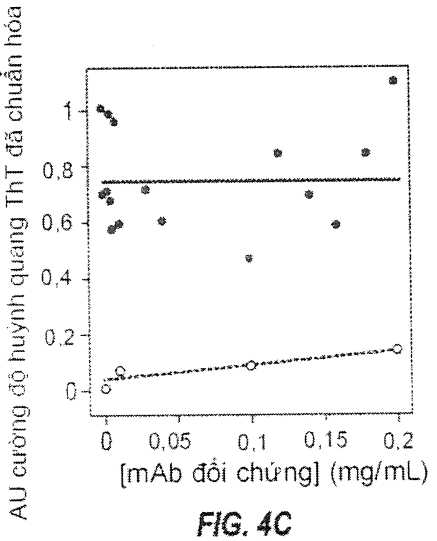


FIG. 4C

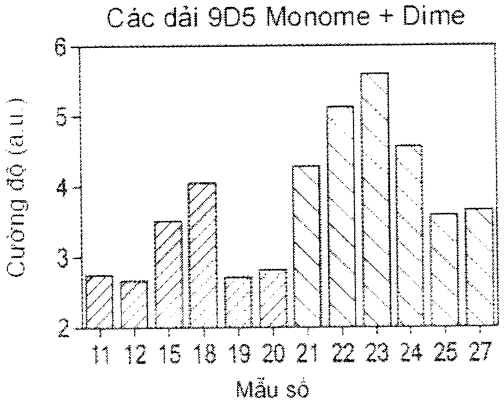


FIG. 5A

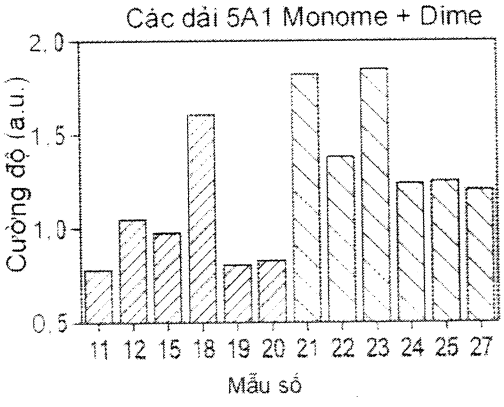


FIG. 5B

8/8

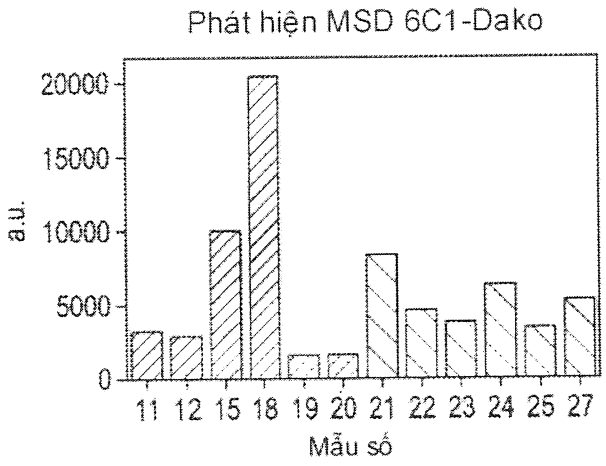


FIG. 6

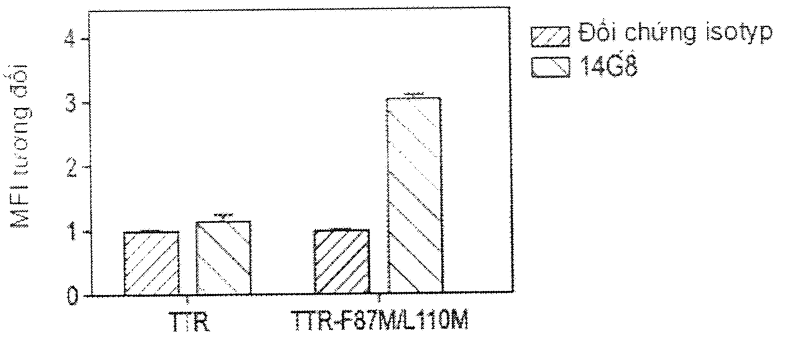


FIG. 7A

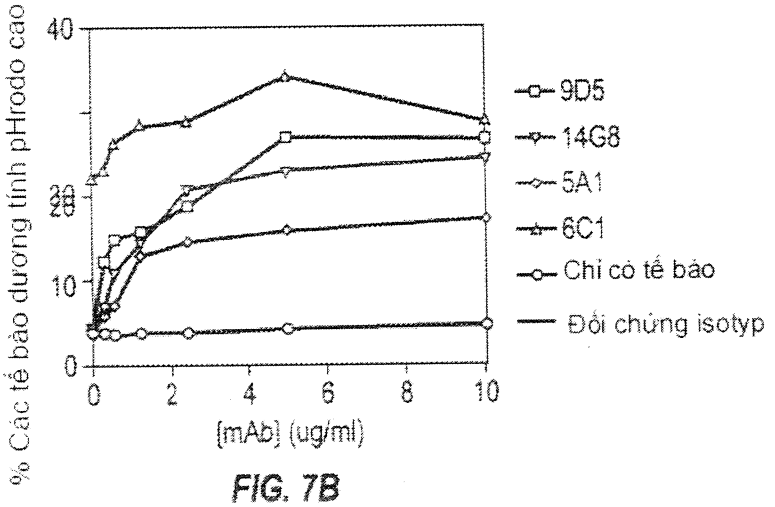


FIG. 7B