(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) **1-0051483**

(51)[2021.01] **C07K 16/28**; A61K 39/00

(13) **B**

(21) 1-2022-04455 (22) 13/01/2021
(86) PCT/US2021/013200 13/01/2021 (87) WO 2021/146256 22/07/2021
(30) 62/960,663 13/01/2020 US; 63/070,728 26/08/2020 US; 63/091,717 14/10/2020 US
(45) 25/09/2025 450 (43) 26/12/2022 417A
(73) DENALI THERAPEUTICS INC. (US)
161 Oyster Point Blvd., South San Francisco, California, 94080, United States of America
(72) DENNIS, Mark S. (US); GU, Zhenyu (CN); KARIOLIS, Mihalis S. (US); MAHON, Cathal S. (IE); MONROE, Kathryn M. (US); PARK, Joshua I. (US); PROROK, Rachel (US); SILVERMAN, Adam P. (US); VAN LENGERICH, Bettina (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ ĐƯỢC PHÂN LẬP MÀ LIÊN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI TREM2 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(21) 1-2022-04455

(57) Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với protein thụ thể khởi động của người được biển hiện trên các tế bào tủy 2 (TREM2). Theo một số phương án, kháng thể này làm giảm mức TREM2 tan được (sTREM2). Theo một số phương án, kháng thể này tăng cường hoạt tính TREM2.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với TREM2, dược phẩm chứa kháng thể này và cách sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Thụ thể hoạt hóa được biểu hiện trên tế bào tủy-2 (triggering receptor expressed on myeloid cell 2-TREM2) là thụ thể xuyên màng được biểu hiện trên vi tế bào thần kinh đệm và được cho là có chức năng điều hòa sự thực bào, khả năng sống sót của tế bào và sự sản xuất các xytokin gây viêm. Các đột biến trong TREM2 đã được xác định ở các bệnh thoái hóa thần kinh bao gồm bệnh Alzheimer, bệnh Nasu-Hakola, bệnh Parkinson, bệnh xơ cứng teo cơ một bên và sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán thái dương. Ngoài ra, các mức thay đổi của TREM2 tan được (soluble TREM2-sTREM2) đã được ghi nhận trong dịch não tủy của những bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer hoặc sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán thái dương có đột biến ở TREM2.

Vẫn có nhu cầu về các chất trị liệu điều biến hoạt tính TREM2 hoặc các mức sTREM2.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2). Theo một số phương án, các kháng thể này bao gồm polypeptit Fc được cải biến mà có thể liên kết vào protein thụ thể transferin. Theo phương án bất kỳ trong số các phương án được bộc lộ trong bản mô tả này, kháng thể này có thể bao gồm các CDR, V_H, và/hoặc V_L theo trình tự bất kỳ trong số các trình tự làm ví dụ được đề xuất trong bản mô tả này, và có thể còn bao gồm polypeptit Fc được cải biến bao gồm các đột biến liên kết thụ thể transferin như được nêu ra trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, kháng thể mà liên kết đặc hiệu với TREM2 bao gồm:

(a) vùng biến đổi bao gồm:

i. trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự của G-F-T-F-T-α_6-F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), trong đó α_6 là D hoặc N;

ii. trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự của V-I-R-N-ββ$_5$-β$_6$-N-β$_8$-Y-T-β$_{11}$-β$_{12}$-Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), trong đó β$_5$ là K hoặc R; β$_6$ là A hoặc P; β$_8$ là G hoặc A; β$_{11}$ là A hoặc T; và β$_{12}$ là G hoặc D;

iii. trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự của γ$_1$-R-L-γ$_4$-Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), trong đó γ$_1$ là A hoặc T; và γ$_4$ là T hoặc S;

iv. trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự của Q-S-S-K-S-L-L-H-S-δ$_{10}$-G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), trong đó δ$_{10}$ là N hoặc T;

v. trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự WMSTRAS (SEQ ID NO:8); và

vi. trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự của Q-Q-F-L-E-φ$_6$-P-F-T (SEQ ID NO:32), trong đó φ$_6$ là Y hoặc F;

(b) polypeptit Fc thứ nhất mà được cải biến để liên kết một cách đặc hiệu vào thụ thể transferin; và

(c) polypeptit Fc thứ hai.

Theo một số phương án, polypeptit Fc thứ nhất và polypeptit Fc thứ hai kết hợp để tạo thành dime Fc.

Theo một số phương án, trình tự CDR-H1 được chọn lựa từ các SEQ ID NO:4 hoặc 12. Theo một số phương án, trình tự CDR-H2 được chọn lựa từ các SEQ ID NO:5, 13, hoặc 25. Theo một số phương án, trình tự CDR-H3 được chọn lựa từ các SEQ ID NO:6, 14, hoặc 17. Theo một số phương án, trình tự CDR-L1 được chọn lựa từ các SEQ ID NO:7 hoặc 23. Theo một số phương án, trình tự CDR-L3 được chọn lựa từ các SEQ ID NO:9 hoặc 18.

Theo một số phương án, vùng biến đổi này bao gồm:

(a) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18; hoặc

(b) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:23, CDR-L2 bao gồm

trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18; hoặc

(c) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18; hoặc

(d) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:23, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18; hoặc

(e) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9; hoặc

(f) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:12, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:13, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:14, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9; hoặc

(g) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9.

Theo một số phương án, vùng biến đổi này bao gồm trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, và 26.

Theo các phương án nhất định, trình tự V_H có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO:15. Theo các phương án nhất định, trình tự V_H có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với SEQ ID NO:15. Theo các phương án nhất định, trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:15.

Theo các phương án nhất định, trình tự V_H có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO:24. Theo các phương án nhất định, trình tự V_H có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với SEQ ID NO:24. Theo các phương án nhất định, trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:24.

Theo một số phương án của khía cạnh này, vùng biến đổi bao gồm trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, và 27.

Theo các phương án nhất định, trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO:16. Theo các phương án nhất định, trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với SEQ ID NO:16. Theo các phương án nhất định, trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:16.

Theo các phương án nhất định, trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO:22. Theo các phương án nhất định, trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với SEQ ID NO:22. Theo các phương án nhất định, trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:22.

Theo các phương án nhất định, trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO:27. Theo các phương án nhất định, trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với SEQ ID NO:27. Theo các phương án nhất định, trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:27.

Theo một số phương án của khía cạnh này, vùng biến đổi này bao gồm:

(a) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:15 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:16; hoặc

(b) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:19 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:20; hoặc

(c) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:21 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:20; hoặc

(d) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:19 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:22; hoặc

(e) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:21 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:22; hoặc

(f) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:20; hoặc

(g) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:26 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:20; hoặc

(h) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:22; hoặc

(i) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:26 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:22; hoặc

(j) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:2 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:3; hoặc

(k) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:10 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:11; hoặc

(l) trình tự V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và trình tự V_L bao gồm SEQ ID NO:27.

Theo một số phương án của khía cạnh này, polypeptit Fc thứ nhất bao gồm: Trp, Leu, hoặc Glu ở vị trí 380; Tyr hoặc Phe ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí 388; Ser, Ala, hoặc Val ở vị trí 389; Ser hoặc Asn ở vị trí 390; Thr hoặc Ser ở vị trí 413; Glu hoặc Ser ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số Châu Âu. Theo một số phương án, polypeptit Fc thứ nhất liên kết vào miền đỉnh của thụ thể transferin. Theo các phương án cụ thể, kháng thể có mức hấp thụ trong não được cải thiện so với kháng thể có dime Fc kiểu hoang.

Theo các phương án nhất định, polypeptit Fc thứ nhất có dạng thay thế T366W và polypeptit Fc thứ hai có các dạng thay thế T366S, L368A, và Y407V, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo các phương án khác, polypeptit Fc thứ nhất có các dạng thay thế T366S, L368A, và Y407V và polypeptit Fc thứ hai có dạng thay thế T366W, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án, polypeptit Fc thứ nhất và/hoặc polypeptit Fc thứ hai bao gồm dạng cải biến mà làm giảm chức năng tác động. Theo các phương án nhất định, dạng cải biến mà làm giảm chức năng tác động bao gồm các dạng thay thế của Ala ở vị trí 234 và Ala ở vị trí 235, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án, polypeptit Fc thứ nhất và/hoặc polypeptit Fc thứ hai bao gồm các dạng cải biến axit amin so với trình tự Fc nguyên thể mà kéo dài thời gian bán hủy huyết thanh. Theo các phương án nhất định, các dạng cải biến axit amin này bao gồm dạng thay thế của Leu ở vị trí 428 và Ser ở vị trí 434, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án của khía cạnh này, polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:41 hoặc SEQ ID NO:64, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:63. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:41; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:64; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án cụ thể, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:42; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:65; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:73; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một số phương án của khía cạnh này, polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:44 hoặc SEQ ID NO:66, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:63. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:44; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:66; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này

bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án cụ thể, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:45; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:67; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:73; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một số phương án của khía cạnh này, polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:47 hoặc SEQ ID NO:68, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:63. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:47; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:68; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án cụ thể, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:48; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:69; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:73; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một số phương án của khía cạnh này, polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:47 hoặc SEQ ID NO:68, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:61 hoặc SEQ ID NO:84. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:47; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:61; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:68; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:84; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án cụ thể, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:48; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:52; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:69; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:72; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một số phương án của khía cạnh này, polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:50 hoặc SEQ ID NO:70, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:63. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:50; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:70; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này

bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo các phương án cụ thể, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:51; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54. Theo các phương án nhất định, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:71; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:73; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:41; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:42; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:64; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:65; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:73; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:44; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:45; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:66; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:67; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:73; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:47; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:48; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và

(iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:68; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:69; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:73; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:47 (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:61; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:48; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:52; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:68; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:61; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng

(heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:69; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:72; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:50; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:51; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:70; (ii) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ hai bao gồm VH bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và (iii) hai chuỗi nhẹ thì mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm VL bao gồm SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể này bao gồm: (i) chuỗi nặng (heavy chain-HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:71; (ii) HC thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:73; và (iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

Theo một số phương án của khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh được mô tả trong bản mô tả này, kháng thể này làm giảm mức của protein TREM2 tan được (sTREM2). Theo một số phương án, kháng thể này tăng cường hoạt tính TREM2. Theo một số phương án, kháng thể này tăng cường mức thực bào hoặc tăng cường mức di chuyển, biệt hóa, chức năng, hoặc sống sót của các tế bào tủy xương, vi tế bào thần kinh đệm, hoặc đại thực bào.

Theo một số phương án, kháng thể này tăng cường chức năng vi tế bào thần kinh đệm mà không làm tăng tình trạng viêm thần kinh. Theo một số phương án, kháng thể này tăng cường mức phosphoryl hóa Syk. Theo một số phương án, kháng thể này tăng cường mức phosphoryl hóa Syk khi có mặt phối tử TREM2. Theo một số phương án, kháng thể này biểu hiện tính phản ứng chéo với protein TREM2 của khỉ đuôi dài.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất dược phẩm chứa kháng thể được phân lập được mô tả trong bản mô tả này và chất mang dược dụng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kit bao gồm: kháng thể được phân lập được mô tả trong bản mô tả này hoặc dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này; và các chỉ dẫn sử dụng của nó.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh thoái hóa thần kinh ở đối tượng, bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể được phân lập được mô tả trong bản mô tả này hoặc dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, bệnh thoái hóa thần kinh được chọn lựa từ nhóm gồm: bệnh Alzheimer, bệnh lý tau liên quan đến tuổi tác nguyên phát, liệt trên nhân tiến triển (progressive supranuclear palsy-PSP), bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương, bệnh sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán-thái dương kèm hội chứng Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17, bệnh sa sút trí tuệ có hạt ưa bạc, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, bệnh xơ cứng teo cơ một bên/hội chứng Parkinson-bệnh sa sút trí tuệ phức hợp của Guam (ALS-PDC), thoái hóa hạch đáy-vỏ não, bệnh não do chấn thương mạn tính, bệnh Creutzfeldt-Jakob, bệnh sa sút trí tuệ do chấn động não, bệnh vôi hóa đám rối sợi thần kinh phân tán, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ có tính cách gia đình kiểu Anh, bệnh sa sút trí tuệ có tính cách gia đình kiểu Đan Mạch, bệnh Gerstmann-Straussler-Scheinker, bệnh lý tau thần kinh đệm hình cầu, hội chứng Parkinson Goa-đê-lốp có bệnh sa sút trí tuệ, PSP Goa-đê-lốp, bệnh Hallervorden-Spatz, bệnh não chất trắng lan tỏa di truyền có hình phỏng cầu (hereditary diffuse leukoencephalopathy with spheroid-HDLS), bệnh Huntington, viêm cơ thể vùi, teo đa hệ thống, loạn dưỡng trương lực cơ, bệnh Nasu-Hakola, bệnh sa sút trí tuệ nổi trội về đám rối sợi thần kinh, bệnh Niemann-Pick loại C, thoái hóa tế bào thần kinh nhạt-mái cầu-chất đen, bệnh Parkinson, bệnh Pick, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột và protein prion, tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ não tiến triển, viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, và bệnh sa sút trí tuệ chỉ do đám rối.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm giảm mức của sTREM2 ở đối tượng có bệnh thoái hóa thần kinh, bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể được phân lập được mô tả trong bản mô tả này hoặc dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường hoạt tính TREM2 ở đối tượng có bệnh thoái hóa thần kinh, bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể được phân lập được mô tả trong bản mô tả này hoặc dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa kháng thể được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:42, 45, 48, 51, 53, 54, và 61.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:42, 53, và 54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:45, 53, và 54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:48, 53, và 54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:48, 52, và 54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất polynucleotit được phân lập bao gồm trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:51, 53, và 54.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vectơ bao gồm polynucleotit được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa polynucleotit được mô tả trong bản mô tả này hoặc vectơ được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp biểu hiện kháng thể mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2

(TREM2), bao gồm: nuôi cấy tế bào chủ được mô tả trong bản mô tả này trong các điều kiện thích hợp cho quá trình biểu hiện kháng thể này.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Các Hình 1A-1H bao gồm các đường cong về khả năng liên kết tế bào được chuẩn độ liều lượng ở tế bào HEK biểu hiện quá mức TREM2-Dap12 của người đối với biến thể được làm tương thích với người và biến thể được tối ưu hóa trình tự của kháng thể kháng TREM2 tiêu biểu (CL0020188).

Hình 2 bao gồm các đường cong liều lượng-đáp ứng về khả năng liên kết vào TREM2 của người ở tế bào HEK 293 đối với ATV:TREM2 tiêu biểu và kháng thể kháng TREM2 tương ứng có Fc không liên kết transferin ("kháng thể kháng TREM2").

Hình 3 bao gồm các đường cong liều lượng-đáp ứng về mức hoạt hóa tín hiệu pSyk bằng ATV:TREM2 tiêu biểu và kháng thể kháng TREM2 tương ứng (TREM2 IgG) trong tế bào HEK 293 biểu hiện TREM2.

Các Hình 4A và 4B bao gồm các đường cong liều lượng-đáp ứng của mức thanh thải lipit ở vi tế bào thần kinh đệm iPSC khi đáp ứng với sự điều trị bằng ATV:TREM2 tiêu biểu.

Các Hình 5A và 5B thể hiện các hình ảnh tiêu biểu về mức tích tụ lipit trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2 sau khi thử thách axit oleic (Hình 5A) có định lượng mức tích tụ lipit trong tế bào được điều trị (Hình 5B).

Hình 5C là bản đồ nhiệt minh họa việc điều biến các mức của triglyxerit, axyl carnitin, và loại trung gian chu trình TCA trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2 sau khi thử thách myelin.

Các Hình 5D-5F bao gồm các biểu đồ dạng cột minh họa sự thay đổi về các mức của triglyxerit, axyl carnitin, và mức loại trung gian chu trình TCA tiêu biểu trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2 sau khi thử thách myelin.

Các Hình 6A-6C bao gồm các biểu đồ dạng cột minh họa sự thay đổi về các mức của các loại triglyxerit, xeramit, và axyl carnitin đặc hiệu trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2 sau khi thử thách myelin.

Hình 7A bao gồm các hình ảnh tiêu biểu từ phương pháp thấm tách phương Tây của các đích con đường tín hiệu mTOR trong vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2.

Các Hình 7B-7E bao gồm các đồ thị minh họa sự thay đổi về các mức của các đích con đường tín hiệu mTOR trong vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2.

Hình 8 là biểu đồ dạng cột minh họa sự thay đổi về các mức của progranulin (PGRN) trong vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2.

Hình 9 là biểu đồ dạng cột minh họa sự thay đổi về các mức của loại bis(monoaxylglyxero)phosphat (BMP) tiêu biểu trong vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2.

Hình 10A là biểu đồ động học tiêu biểu của mức tiêu thụ oxy trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2.

Hình 10B là biểu đồ dạng cột minh họa dung tích hô hấp tối đa của các tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng ATV:TREM2 khi có mặt và thiếu vắng chất ức chế CPT1.

Hình 11A là đường cong liều lượng-đáp ứng đối với khả năng sống của tế bào trong tế bào đại thực bào của người được điều trị bằng kháng thể kháng TREM2.

Các Hình 11B và 11C bao gồm các biểu đồ dạng cột minh họa EC50 và Emax đối với các đường cong liều lượng-đáp ứng trên Hình 11A.

Hình 12 là bản đồ nhiệt của mức giải phóng xytokin tương đối trong tế bào đại thực bào của người được điều trị bằng kháng thể kháng TREM2.

Các Hình 13A-13C bao gồm các đồ thị dạng núi lửa phun minh họa các mức thay đổi tương đối về loại triglyxerit trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng kháng thể kháng TREM2.

Các Hình 13D và 13E bao gồm các biểu đồ dạng cột thể hiện sự thay đổi về các mức của loại triglyxerit tiêu biểu trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng kháng thể kháng TREM2.

Hình 14A là đồ thị về mức TREM2 ở dạng hàm số của nồng độ kháng thể trong sản phẩm phân giải tế bào của các tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng kháng thể kháng TREM2.

Hình 14B là đồ thị về mức TREM2 ở dạng hàm số của nồng độ kháng thể trong các môi trường nuôi cấy tế bào của các tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC được điều trị bằng kháng thể kháng TREM2.

Hình 15 là đồ thị minh họa profin dược động của kháng thể kháng TREM2 được cho dùng theo liều lượng ở khỉ đuôi dài.

Các Hình 16A và 16B là các đồ thị thể hiện các tế bào EdU^+Iba^+ cho mỗi mm^2 (Hình 16A) và diện tích Iba^+ tương đối (Hình 16B) ở não của chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người được điều trị bằng ATV:TREM2 hoặc ATV:RSV.

Các Hình 17A và 17B là các đồ thị thể hiện các tế bào EdU^+Iba^+ cho mỗi mm^2 (Hình 17A) và diện tích Iba^+ tương đối (Hình 17B) ở não của chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người được điều trị bằng ATV:TREM2, kháng thể TREM2 tương ứng, kháng thể tham chiếu số 2, hoặc ATV:RSV. Các biểu đồ thể hiện giá trị trung bình ± sai số chuẩn và trị số p: phương pháp ANOVA một chiều có kiểm nghiệm đa so sánh Tukey; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Các Hình 18A và 18B là các đồ thị thể hiện các mức xytokin IP-10 (Hình 18A) và MCP-5 (Hình 18B) ở não của chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người được điều trị bằng ATV:TREM2, kháng thể TREM2 tương ứng, kháng thể tham chiếu số 2, hoặc ATV:RSV. Các biểu đồ thể hiện trị số trung bình khắp các lần lặp lại thử nghiệm ± sai số chuẩn. Các biểu đồ thể hiện giá trị trung bình ± sai số chuẩn và trị số p: phương pháp ANOVA một chiều có kiểm nghiệm đa so sánh Tukey; ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Hình 19 là đồ thị thể hiện mức CSF1R dấu ấn thần kinh đệm ở não của chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người được điều trị bằng ATV:TREM2, kháng thể TREM2 tương ứng, kháng thể tham chiếu số 2, hoặc ATV:RSV. Các biểu đồ thể hiện giá trị trung bình ± sai số chuẩn và trị số p: phương pháp ANOVA một chiều có kiểm nghiệm đa so sánh Tukey; * $p \leq 0,05$, ** $p \leq 0,01$, *** $p \leq 0,001$, **** $p \leq 0,0001$.

Hình 20 là đồ thị thể hiện profin PK huyết tương của ATV:TREM2, kháng thể TREM2 tương ứng, kháng thể tham chiếu số 2, hoặc ATV:RSV ở chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người.

Hình 21 là đồ thị thể hiện profin PK não của ATV:TREM2, kháng thể TREM2 tương ứng, kháng thể tham chiếu số 2, hoặc ATV:RSV ở chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. DẪN NHẬP

TREM2 là thụ thể xuyên màng được biểu hiện trên bề mặt tế bào của vi tế bào thần kinh đệm, tế bào đuôi gai, đại thực bào và tế bào hủy xương. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết cụ thể, có căn cứ cho rằng khi liên kết với phối tử, TREM2 tạo ra phức hợp truyền tín hiệu với protein tiếp hợp xuyên màng, protein hoạt hóa DNAX 12 (DAP12), DNAX 12 lại được phosphoryl hóa tyrosin bằng protein kinaza SRC. Có căn cứ cho rằng phức hợp truyền tín hiệu TREM2/DAP12 được hoạt hóa này làm trung gian cho việc truyền tín hiệu nội bào bằng cách thu nạp và phosphoryl hóa các kinaza như kinaza Syk. Quá trình truyền tín hiệu TREM2/DAP12 điều biến các hoạt tính như thực bào, khả năng tăng trưởng và sống sót của tế bào, tiết xytokin gây viêm, và khả năng di chuyển của các tế bào như tế bào vi thần kinh đệm và đại thực bào. TREM2 trải qua quá trình phân giải protein nội màng đã được điều hòa, trong đó TREM2 có chiều dài đầy đủ gắn liền với màng được phân cắt bởi proteinaza kim loại ADAM10 thành phần sTREM2 mà được lột bỏ khỏi tế bào và mảnh đầu tận cùng C được giữ lại trên màng bị phân hủy tiếp bởi gamma-secretaza. Các mức sTREM2 đã được thay đổi được ghi nhận ở những bệnh nhân mắc bệnh Alzheimer hoặc sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán thái dương và có đột biến trong TREM2. Ngoài ra, các đột biến trong TREM2 có liên quan đến các chức năng đã bị thay đổi như sự thực bào suy giảm và chức năng vi tế bào thần kinh đệm giảm.

Như được trình bày chi tiết trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây, các kháng thể đã được tạo ra mà liên kết đặc hiệu với TREM2 của người và điều biến một hoặc nhiều chức năng phía cuối nguồn của phức hợp truyền tín hiệu TREM2/DAP12. Theo các phương án nhất định, các kháng thể này còn bao gồm polypeptit Fc chứa đột biến mà cho phép liên kết polypeptit Fc vào thụ thể transferin (TfR từ, *ví dụ,* người). Theo một số khía cạnh, các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này có thể liên kết, thông qua polypeptit Fc được cải biến, vào protein thụ thể transferin (*ví dụ,* được biểu hiện trên bề mặt của tế bào nội

mạc não (brain endothelial cell-BEC)) và nhờ đó có thể băng qua hàng rào máu-não (blood-brain barrier-BBB) một cách hữu hiệu hơn các kháng thể thiếu đột biến Fc liên kết TfR. Theo các phương án nhất định, các kháng thể được bộc lộ trong bản mô tả này chứa các đột biến ở polypeptit Fc mà làm giảm hoặc loại bỏ chức năng tác động và các đột biến mà làm tăng thời gian bán hủy *in vivo*, *ví dụ,* bằng cách làm tăng mức liên kết của kháng thể Fc vào thụ thể sơ sinh Fc (FcRn).

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM2 tăng cường hoạt tính TREM2, *ví dụ,* tăng cường khả năng thực bào hoặc tăng cường khả năng biệt hóa, chức năng, khả năng di chuyển hoặc sống sót của các tế bào tủy, vi tế bào thần kinh đệm, hoặc đại thực bào. Như vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp tăng cường hoạt tính TREM2, *ví dụ,* ở đối tượng bị bệnh thoái hóa thần kinh.

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM2 làm giảm mức lột bỏ sTREM2. Vì vậy, theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp làm giảm mức sTREM2, *ví dụ,* ở đối tượng bị bệnh thoái hóa thần kinh.

II. CÁC ĐỊNH NGHĨA

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các dạng số ít "một", và "này" bao gồm các dạng đề cập số nhiều trừ khi nội dung quy định rõ ràng là khác. Do đó, ví dụ, dạng đề cập "một kháng thể" tùy ý bao gồm dạng kết hợp của hai phân tử như vậy trở lên, và các dạng đề cập tương tự.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, các thuật ngữ "khoảng" và "xấp xỉ", khi được sử dụng để bổ nghĩa cho một lượng được chỉ rõ bằng một trị số hoặc khoảng trị số, biểu lộ rằng trị số này cũng như độ lệch hợp lý so với trị số mà người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này đã biết, ví dụ ± 20%, ± 10%, hoặc ± 5%, nằm trong nghĩa được dự định của trị số được liệt kê.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "protein TREM2" đề cập đến protein thụ thể hoạt hóa được biểu hiện trên tế bào tủy 2 mà được mã hóa bởi gen *TREM2*. Như được sử dụng trong bản mô tả này, "protein TREM2" đề cập đến protein TREM2 nguyên thể (*tức là* kiểu hoang) của động vật có xương sống bất kỳ, như, nhưng không giới hạn ở, người, động vật linh trưởng không phải người (*ví dụ,* khỉ đuôi dài), động vật gặm nhấm (*ví dụ,* chuột nhắt, chuột cống), và các loài động vật có vú khác. Theo một số phương án,

protein TREM2 là protein TREM2 của người có trình tự được xác định bằng số hiệu gia nhập UniprotKB: Q9NZC2 (SEQ ID NO:1).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể kháng TREM2" dùng để chỉ kháng thể liên kết đặc hiệu với protein TREM2 (*ví dụ,* TREM2 của người).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "kháng thể" dùng để chỉ protein với kiểu xoắn gấp của globulin miễn dịch mà liên kết đặc hiệu với kháng nguyên thông qua các vùng biến đổi của nó. Thuật ngữ này bao gồm các kháng thể đa dòng nguyên vẹn, kháng thể đơn dòng nguyên vẹn, kháng thể chuỗi đơn, kháng thể đa đặc hiệu như kháng thể đặc hiệu kép, kháng thể đặc hiệu đơn, kháng thể hóa trị một, kháng thể thể khảm, kháng thể được làm tương thích với người và kháng thể người. Thuật ngữ "kháng thể" như được sử dụng trong bản mô tả này cũng bao gồm các mảnh kháng thể giữ được tính đặc hiệu liên kết thông qua các vùng biến đổi của nó, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fab, $F(ab')_2$, Fv, scFv, và scFv hóa trị hai. Các kháng thể có thể chứa các chuỗi nhẹ được phân loại là kappa hoặc lambda. Các kháng thể có thể chứa các chuỗi nặng được phân loại là gamma, mu, alpha, delta hoặc epsilon, mà lần lượt xác định các nhóm globulin miễn dịch, IgG, IgM, IgA, IgD và IgE.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên kháng TREM2" được dùng để chỉ mảnh liên kết kháng nguyên hoặc thực thể mà liên kết đặc hiệu với protein TREM2 (*ví dụ,* TREM2 của người). Các thuật ngữ "phần liên kết kháng nguyên" và "mảnh liên kết kháng nguyên" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này và được dùng để chỉ một hoặc nhiều mảnh của kháng thể mà giữ lại khả năng liên kết một cách đặc hiệu vào kháng nguyên (*ví dụ,* protein TREM2) thông qua vùng biến đổi của nó. Các ví dụ về mảnh liên kết kháng nguyên bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, mảnh Fab (mảnh hóa trị một gồm các miền V_L, V_H, CL và CH1), mảnh $F(ab')_2$ (mảnh hóa trị hai bao gồm hai mảnh Fab được liên kết bằng cầu nối disulfua ở vùng bản lề), Fv chuỗi đơn (single chain Fv-scFv), Fv được liên kết bằng disulfua (disulfide linked FV-dsFv), các vùng quyết định tính bổ sung (complementarity determining region-CDR), V_L (vùng biến đổi chuỗi nhẹ), và V_H (vùng biến đổi chuỗi nặng).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" dùng để chỉ miền trong chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có nguồn gốc từ gen Biến đổi (V), gen Đa dạng (D) hoặc gen Nối (J) (và không có nguồn gốc từ đoạn gen Hằng định (Cμ và Cδ)) của dòng mầm, và điều đó

mang lại cho kháng thể tính đặc hiệu để liên kết với kháng nguyên. Thông thường, vùng biến đổi của kháng thể bao gồm bốn vùng "khung" được bảo tồn xen kẽ với ba "vùng quyết định tính bổ sung" siêu biến.

Thuật ngữ "vùng quyết định tính bổ sung" hay "CDR" đề cập đến ba vùng siêu biến trong mỗi chuỗi mà làm gián đoạn bốn vùng khung được thiết lập bởi các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và nặng. Các CDR chịu trách nhiệm chính cho việc liên kết của kháng thể với epitop của kháng nguyên. Các CDR của mỗi chuỗi thường được gọi là CDR1, CDR2 và CDR3, được đánh số thứ tự bắt đầu từ đầu tận cùng N, và cũng thường được xác định bởi chuỗi mà CDR cụ thể nằm trong đó. Do đó, V_H CDR3 hoặc CDR-H3 nằm trong vùng biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể mà nó được tìm thấy, trong khi V_L CDR1 hoặc CDR-L1 là CDR1 từ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể mà nó được tìm thấy.

"Các vùng khung" hay "các FR" của các chuỗi nặng hoặc nhẹ khác nhau được bảo tồn tương đối ở loài. Vùng khung của kháng thể, là các vùng khung kết hợp của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng cấu thành, có vai trò định vị và xếp thẳng hàng các CDR trong không gian ba chiều. Các trình tự khung có thể nhận được từ cơ sở dữ liệu ADN công khai hoặc tài liệu tham khảo đã xuất bản bao gồm trình tự gen kháng thể dòng mầm. Ví dụ, các trình tự ADN dòng mầm cho các gen vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người có thể được tìm thấy trong cơ sở dữ liệu trình tự gen biến đổi dòng mầm "VBASE2" cho các trình tự của người và chuột.

Các trình tự axit amin của các CDR và các vùng khung có thể được xác định bằng cách sử dụng các định nghĩa đã biết khác nhau trong lĩnh vực này, *ví dụ,* Kabat, Chothia, cơ sở dữ liệu ImMunoGeneTics quốc tế (IMGT), AbM, và các dạng tiếp xúc kháng nguyên quan sát được ("Dạng tiếp xúc"). Theo một số phương án, các CDR được xác định theo định nghĩa về Dạng tiếp xúc. *Xem*, MacCallum *và đồng tác giả, J. Mol. Biol.,* 262: 732-745 (1996). Theo một số phương án, CDR được xác định bởi sự kết hợp của các định nghĩa về Kabat, Chothia và/hoặc CDR Tiếp xúc.

Thuật ngữ "epitop" dùng để chỉ khu vực hoặc vùng của kháng nguyên mà các CDR của kháng thể liên kết đặc hiệu với và có thể bao gồm một vài axit amin hoặc các phần của một vài axit amin, *ví dụ,* 5 hoặc 6, hoặc nhiều hơn, *ví dụ,* 20 axit amin hoặc nhiều hơn, hoặc các phần của các axit amin đó. *Ví dụ,* trong trường hợp đích là protein, thì các epitop có thể bao gồm các axit amin liên tiếp (*ví dụ,* epitop tuyến tính), hoặc các axit amin từ các

phần khác nhau của protein mà được mang lại gần nhau bằng cách gấp nếp protein (*ví dụ,* epitop không liên tục hoặc theo hình thể). Theo một số phương án, epitop được phosphoryl hóa ở một axit amin (*ví dụ,* ở gốc serin hoặc threonin).

Như được sử dụng trong bản mô tả này, cụm từ "nhận biết epitop", như được sử dụng để đề cập đến kháng thể kháng TREM2, có nghĩa là các CDR của kháng thể tương tác với hoặc liên kết đặc hiệu với kháng nguyên (*tức là,* protein TREM2) tại epitop đó hoặc phần kháng nguyên chứa epitop đó.

"Kháng thể đơn dòng" dùng để chỉ các kháng thể được tạo ra bởi dòng đơn lẻ của các tế bào hoặc dòng tế bào đơn lẻ và gồm có hoặc về cơ bản gồm có các phân tử kháng thể giống hệt nhau về trình tự axit amin sơ cấp của chúng.

"Kháng thể đa dòng" dùng để chỉ kháng thể nhận được từ quần thể kháng thể không đồng nhất, trong đó các kháng thể khác nhau trong quần thể này liên kết với các epitop khác nhau của kháng nguyên.

"Kháng thể thể khảm" đề cập đến phân tử kháng thể trong đó vùng hằng định, hoặc một phần của nó, được thay đổi, thay thế hoặc trao đổi để vị trí liên kết kháng nguyên (*tức là* vùng biến đổi, CDR, hoặc một phần của nó) được liên kết với vùng hằng định của nhóm, chức năng tác động và/hoặc loài khác nhau hoặc được thay đổi, hoặc trong đó vùng biến đổi, hoặc một phần của nó, được thay đổi, thay thế hoặc trao đổi với vùng biến đổi có tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau hoặc bị thay đổi (*ví dụ,* CDR và các vùng khung từ các loài khác nhau). Theo một số phương án, kháng thể thể khảm là kháng thể đơn dòng bao gồm vùng biến đổi từ một nguồn hoặc loài (*ví dụ,* chuột) và vùng hằng định được lấy từ nguồn hoặc loài thứ hai (*ví dụ,* người). Các phương pháp sản xuất kháng thể thể khảm được mô tả trong lĩnh vực này.

"Kháng thể được làm tương thích với người" là globulin miễn dịch thể khảm có nguồn gốc từ nguồn không phải của người (*ví dụ,* chuột) chứa các trình tự nhỏ nhất có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người nằm ngoài các CDR. Nhìn chung, kháng thể được làm tương thích với người sẽ bao gồm ít nhất một (*ví dụ,* hai) miền biến đổi liên kết kháng nguyên, trong đó các vùng CDR này về cơ bản tương ứng với các vùng CDR của globulin miễn dịch không phải của người và các vùng khung này về cơ bản tương ứng với các vùng khung của trình tự globulin miễn dịch của người. Kháng thể được làm tương thích với người cũng có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định của globulin miễn dịch

(Fc), điển hình là vùng của trình tự globulin miễn dịch của người. Các phương pháp làm tương thích với kháng thể người đã được biết đến trong lĩnh vực này.

"Kháng thể người" hoặc "kháng thể hoàn toàn của người" là kháng thể có trình tự chuỗi nặng và trình tự chuỗi nhẹ của người, điển hình có nguồn gốc từ các gen dòng mầm của người. Theo một số phương án, kháng thể được tạo ra bằng tế bào người, bằng động vật không phải người mà sử dụng các nguồn kháng thể người (*ví dụ,* chuột chuyển gen được thao tác về mặt gen để biểu hiện các trình tự kháng thể người), hoặc bằng các nền tảng thể hiện trên thể thực khuẩn.

Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu" dùng để chỉ phân tử (*ví dụ,* kháng thể hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) mà liên kết với epitop hoặc đích nào đó với ái lực lớn hơn, ái tính mạnh hơn, và/hoặc với thời gian dài hơn với epitop hoặc đích đó trong một mẫu nào đó so với khi nó liên kết với epitop khác hoặc hợp chất không phải đích (*ví dụ,* kháng nguyên khác nhau về cấu trúc). Theo một số phương án, kháng thể (hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) liên kết đặc hiệu với epitop hoặc đích là kháng thể (hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) mà liên kết với epitop hoặc đích với ái lực lớn hơn ít nhất là 5 lần so với các epitop khác hoặc các hợp chất không phải đích, *ví dụ,* ái lực ít nhất 5 lần, 10 lần, 100 lần, 1.000 lần, 10.000 lần trở lên. Thuật ngữ "liên kết đặc hiệu", "liên kết một cách đặc hiệu với" hoặc "đặc hiệu với" epitop hoặc đích cụ thể, như được sử dụng trong bản mô tả này, có thể được thể hiện, ví dụ, bởi phân tử có hằng số phân ly cân bằng K_D đối với epitop hoặc đích mà nó liên kết với, *ví dụ,* 10^{-4} M hoặc nhỏ hơn, *ví dụ,* 10^{-5} M, 10^{-6} M, 10^{-7} M, 10^{-8} M, 10^{-9} M, 10^{-10} M, 10^{-11} M, hoặc 10^{-12} M. Người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này sẽ nhận ra rằng kháng thể liên kết đặc hiệu với đích (*ví dụ,* protein TREM2) từ một loài cũng có thể liên kết đặc hiệu với các gen trực giao của đích đó (*ví dụ,* protein TREM2).

Thuật ngữ "ái lực liên kết" được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến độ mạnh của tương tác không cộng hóa trị giữa hai phân tử, *ví dụ,* giữa kháng thể (hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) và kháng nguyên. Vì vậy, ví dụ, thuật ngữ này có thể đề cập đến tương tác 1: 1 giữa kháng thể (hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) và kháng nguyên, trừ khi có chỉ dẫn khác hoặc rõ ràng từ ngữ cảnh. Ái lực liên kết có thể được định lượng bằng cách đo hằng số phân ly cân bằng (K_D), chỉ hằng số tốc độ phân ly (k_d, thời gian^{-1}) chia cho hằng số tốc độ liên kết (k_a, thời gian^{-1} M^{-1}). K_D có thể được xác định bằng phép

đo động học của sự hình thành và phân ly phức hợp, *ví dụ,* sử dụng các phương pháp Cộng hưởng Plasmon Bề mặt (SPR), *ví dụ,* hệ thống Biacore™; các thử nghiệm loại trừ động học như KinExA®; và phép đo giao thoa BioLayer (*ví dụ,* sử dụng nền tảng ForteBio® Octet). Như được sử dụng trong bản mô tả này, "ái lực liên kết" không chỉ bao gồm các ái lực liên kết chính thức, như các ái lực phản ánh tương tác 1: 1 giữa kháng thể (hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó) và kháng nguyên, mà còn bao gồm các ái lực biểu kiến mà các trị số K_D được tính toán có thể phản ánh liên kết mong muốn.

Thuật ngữ "phản ứng chéo", như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến khả năng của kháng thể liên kết với kháng nguyên khác với kháng nguyên mà kháng thể đó đã được tạo ra để kháng lại. Theo một số phương án, khả năng phản ứng chéo đề cập đến khả năng của kháng thể liên kết với kháng nguyên từ một loài khác chứ không phải là kháng nguyên mà kháng thể đó đã được tạo ra để kháng lại. Ví dụ không giới hạn là kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này được tạo ra kháng lại peptit TREM2 của người có thể thể hiện khả năng phản ứng chéo với protein hoặc peptit TREM2 từ một loài khác (*ví dụ,* khỉ hoặc chuột).

"Thụ thể transferin" hay "TfR" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ protein thụ thể transferin 1. Trình tự polypeptit thụ thể transferin 1 của người này được nêu ra ở SEQ ID NO:62. Các trình tự protein thụ thể transferin 1 từ loài khác thì cũng đã biết (*ví dụ,* tinh tinh, số hiệu gia nhập XP_003310238.1; khỉ redut, NP_001244232.1; chó, NP_001003111.1; gia súc, NP_001193506.1; chuột nhắt, NP_035768.1; chuột cống, NP_073203.1; và gà, NP_990587.1). Thuật ngữ "thụ thể transferin" cũng bao quát biến thể alen của các trình tự tham chiếu làm ví dụ, *ví dụ,* trình tự của người, trình tự này được mã hóa bởi gen ở ổ gen nhiễm sắc thể protein thụ thể transferin 1. Protein thụ thể transferin có chiều dài đầy đủ bao gồm vùng nội bào đầu tận cùng N ngắn, vùng xuyên màng, và miền ngoại bào lớn. Miền ngoại bào này đặc trưng bởi ba miền: miền giống proteaza, miền chuỗi xoắn, và miền đỉnh. Trình tự miền đỉnh của thụ thể transferin 1 của người được nêu ra ở SEQ ID NO:55.

Các thuật ngữ "miền CH3" và "miền CH2" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ polypeptit miền của vùng hằng định globulin miễn dịch. Trong ngữ cảnh về kháng thể IgG, polypeptit miền CH3 được dùng để chỉ đoạn của các axit amin từ khoảng vị trí 341 đến khoảng vị trí 447 như được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu, và

polypeptit miền CH2 được dùng để chỉ đoạn của các axit amin từ khoảng vị trí 231 đến khoảng vị trí 340 như được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu. Các polypeptit miền CH2 và CH3 cũng có thể được đánh số bằng giản đồ đánh số IMGT (ImMunoGeneTics) mà trong đó cách đánh số miền CH2 là 1-110 và cách đánh số miền CH3 là 1-107, theo cách đánh số biểu đồ Scientific của IMGT (trang mạng của IMGT). Các miền CH2 và CH3 là một phần của vùng Fc của globulin miễn dịch. Trong ngữ cảnh về kháng thể IgG, vùng Fc được dùng để chỉ đoạn của các axit amin từ khoảng vị trí 231 đến khoảng vị trí 447 như được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng Fc" cũng có thể bao gồm ít nhất một phần của vùng bản lề của kháng thể. Một trình tự vùng bản lề một phần làm ví dụ được nêu ra ở SEQ ID NO:57.

Các thuật ngữ "tương ứng với", "được xác định liên quan đến", hoặc "được đánh số liên quan đến" khi được sử dụng trong ngữ cảnh về việc nhận diện một gốc axit amin đã cho ở trình tự polypeptit, được dùng để chỉ vị trí của gốc của trình tự tham chiếu được chỉ rõ khi trình tự axit amin đã cho được xếp thẳng hàng ở mức tối đa và so sánh với trình tự tham chiếu. Vì vậy, ví dụ, gốc axit amin ở polypeptit "tương ứng với" axit amin trong vùng của SEQ ID NO:38 từ các axit amin 111-217 khi gốc này xếp thẳng hàng với axit amin ở SEQ ID NO:38 khi được xếp thẳng hàng một cách tối ưu với SEQ ID NO:38. Polypeptit mà được xếp thẳng hàng với trình tự tham chiếu không cần phải cùng độ dài với trình tự tham chiếu.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "polypeptit Fc" được dùng để chỉ vùng đầu tận cùng C của polypeptit chuỗi nặng của globulin miễn dịch có trong tự nhiên mà đặc trưng bởi dạng gấp cuộn Ig trong vai trò là miền cấu trúc. Polypeptit Fc chứa trình tự vùng hằng định bao gồm cả ít nhất miền CH2 và/hoặc miền CH3 và có thể chứa ít nhất một phần của vùng bản lề, nhưng không chứa vùng biến đổi.

"Polypeptit Fc được cải biến" được dùng để chỉ polypeptit Fc mà có ít nhất một đột biến, *ví dụ,* dạng thay thế, xóa bỏ hoặc chèn, so với trình tự polypeptit Fc chuỗi nặng của globulin miễn dịch kiểu hoang, nhưng giữ lại dạng gấp cuộn Ig tổng thể hoặc cấu trúc của polypeptit Fc nguyên thể.

Thuật ngữ "được phân lập", được sử dụng để chỉ axit nucleic hoặc protein (*ví dụ,* kháng thể), có nghĩa là axit nucleic hoặc protein về cơ bản không có các thành phần tế bào khác mà nó gắn liền ở trạng thái tự nhiên. Độ tinh khiết và độ đồng nhất thường được xác định

bằng cách sử dụng các kỹ thuật hóa học phân tích như điện di (*ví dụ,* điện di trên gel polyacrylamit) hoặc sắc ký (*ví dụ,* sắc ký lỏng hiệu năng cao). Theo một số phương án, axit nucleic hoặc protein được phân lập (*ví dụ,* kháng thể) có độ tinh khiết ít nhất là 85%, ít nhất 90%, ít nhất 95% hoặc ít nhất 99%.

Thuật ngữ "axit amin" đề cập đến các axit amin tổng hợp và có trong tự nhiên, cũng như các chất tương tự axit amin và các chất giả axit amin mà có chức năng tương tự với các axit amin có trong tự nhiên. Các axit amin có trong tự nhiên là những axit amin được mã hóa bằng mã di truyền, cũng như những axit amin được biến đổi sau này, *ví dụ,* hydroxyprolin, γ-carboxyglutamat và O-phosphoserin. Các α-axit amin có trong tự nhiên bao gồm, mà không giới hạn ở, alanin (Ala), xystein (Cys), axit aspartic (Asp), axit glutamic (Glu), phenylalanin (Phe), glyxin (Gly), histidin (His), isoleuxin (Ile), arginin (Arg), lysin (Lys), leuxin (Leu), metionin (Met), asparagin (Asn), prolin (Pro), glutamin (Gln), serin (Ser), threonin (Thr), valin (Val), tryptophan (Trp), tyrosin (Tyr), và các dạng kết hợp của chúng. Các chất đồng phân lập thể của các α-axit amin có trong tự nhiên bao gồm, nhưng không giới hạn, D-alanin (D-Ala), D-xystein (D-Cys), axit D-aspartic (D-Asp), axit D-glutamic (D-Glu), D-phenylalanin (D-Phe), D-histidin (D-His), D-isoleuxin (D-Ile), D-arginin (D-Arg), D-lysin (D-Lys), D-leuxin (D-Leu), D-metionin (D-Met), D-asparagin (D -Asn), D-prolin (D-Pro), D-glutamin (D-Gln), D-serin (D-Ser), D-threonin (D-Thr), D-valin (D-Val), D -tryptophan (D-Trp), D-tyrosin (D-Tyr), và các dạng kết hợp của chúng. "Các chất tương tự axit amin" dùng để chỉ các hợp chất có cùng cấu trúc hóa học cơ bản ở dạng axit amin có trong tự nhiên, *tức là* cacbon α liên kết với hydro, nhóm carboxyl, nhóm amin và nhóm R, *ví dụ,* homoserin, norleuxin, metionin sulfoxit, metionin metyl sulfoni. Các chất tương tự như vậy có các nhóm R được biến đổi (*ví dụ,* norleuxin) hoặc khung peptit được cải biến, nhưng vẫn giữ được cùng một cấu trúc hóa học cơ bản với axit amin có trong tự nhiên. "Các chất giả axit amin" dùng để chỉ các hợp chất hóa học có cấu trúc khác với cấu trúc hóa học chung của axit amin, nhưng hoạt động theo một phương thức tương tự với axit amin có trong tự nhiên. Các axit amin có thể đề cập trong bản mô tả này bằng ký hiệu ba chữ cái thường được biết đến của chúng hoặc bằng các ký hiệu một chữ cái được khuyến nghị bởi Ủy ban Danh pháp Hóa sinh IUPAC-IUB.

Thuật ngữ "polypeptit" và "peptit" được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này đề cập đến polyme của các gốc axit amin trong chuỗi đơn. Các thuật ngữ áp dụng cho các polyme axit amin trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin là chất giả hóa học nhân tạo của

axit amin có trong tự nhiên tương ứng, cũng như các polyme axit amin có trong tự nhiên và polyme axit amin không có trong tự nhiên. Polyme axit amin có thể bao gồm chỉ các L-axit amin, chỉ các D-axit amin, hoặc hỗn hợp của L và D axit amin.

Thuật ngữ "protein" như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến polypeptit hoặc dime (*tức là* hai) hoặc multime (*tức là* ba hoặc nhiều hơn) của các polypeptit chuỗi đơn. Các polypeptit chuỗi đơn của protein có thể được nối với nhau bằng liên kết cộng hóa trị, *ví dụ,* liên kết disulfua hoặc các tương tác không cộng hóa trị.

Thuật ngữ "polynucleotit" và "axit nucleic" dùng thay thế cho nhau để chỉ các chuỗi nucleotit có độ dài bất kỳ, và bao gồm ADN và ARN. Các nucleotit có thể là deoxyribonucleotit, ribonucleotit, nucleotit hoặc bazơ cải biến, và/hoặc các chất tương tự của chúng, hoặc các cơ chất bất kỳ có thể được kết hợp vào chuỗi bởi ADN hoặc ARN polymeraza. Polynucleotit có thể bao gồm các nucleotit cải biến, như các nucleotit đã được metyl hóa và các chất tương tự của chúng. Ví dụ về polynucleotit được dự tính trong bản mô tả này bao gồm ADN dải đơn và dải kép, ARN dải đơn và dải kép, và các phân tử lai có các hỗn hợp của ADN và ARN dải đơn và dải kép.

Thuật ngữ "dạng thế bảo tồn" và "đột biến bảo tồn" đề cập đến sự thay đổi dẫn đến sự thay thế một axit amin bằng một axit amin khác có thể được phân loại là có đặc tính tương tự. Các ví dụ về các loại nhóm axit amin bảo tồn được xác định theo cách này có thể bao gồm: "nhóm tích điện/phân cực" bao gồm Glu (axit Glutamic hoặc E), Asp (axit Aspartic hoặc D), Asn (Asparagin hoặc N), Gln (Glutamin hoặc Q), Lys (Lysin hoặc K), Arg (Arginin hoặc R), và His (Histidin hoặc H); "nhóm thơm" bao gồm Phe (Phenylalanin hoặc F), Tyr (Tyrosin hoặc Y), Trp (Tryptophan hoặc W), và (Histidin hoặc H); và "nhóm béo" bao gồm Gly (Glyxin hoặc G), Ala (Alanin hoặc A), Val (Valin hoặc V), Leu (Leuxin hoặc L), Ile (Isoleuxin hoặc I), Met (Metionin hoặc M), Ser (Serin hoặc S), Thr (Threonin hoặc T), và Cys (Xystein hoặc C). Trong mỗi nhóm, các nhóm con cũng có thể được xác định. Ví dụ, nhóm của các axit amin tích điện hoặc phân cực có thể được chia nhỏ tiếp thành các nhóm con bao gồm: "nhóm con mang điện tích dương" bao gồm Lys, Arg và His; "nhóm con mang điện tích âm" bao gồm Glu và Asp; và "nhóm con phân cực" bao gồm Asn và Gln. Trong một ví dụ khác, nhóm thơm hoặc nhóm vòng có thể được chia nhỏ tiếp thành các nhóm con bao gồm: "nhóm con vòng nitơ" bao gồm Pro, His và Trp; và "nhóm con phenyl" bao gồm Phe và Tyr. Trong một ví dụ khác nữa, nhóm béo có thể được chia nhỏ

tiếp thành các nhóm con, *ví dụ,* "nhóm con béo không phân cực" bao gồm Val, Leu, Gly, và Ala; và "nhóm con béo phân cực ít" bao gồm Met, Ser, Thr và Cys. Ví dụ về các loại đột biến bảo tồn bao gồm các dạng thế axit amin của các axit amin trong các nhóm con ở trên, như, nhưng không giới hạn ở: Lys cho Arg hoặc ngược lại, sao cho có thể duy trì điện tích dương; Glu cho Asp hoặc ngược lại, sao cho có thể duy trì điện tích âm; Ser cho Thr hoặc ngược lại, sao cho có thể duy trì nhóm -OH tự do; và Gln cho Asn hoặc ngược lại, sao cho có thể duy trì nhóm -NH_2 tự do. Theo một số phương án, các axit amin kỵ nước được thay thế cho axit amin kỵ nước có trong tự nhiên, *ví dụ,* ở vị trí hoạt động, để bảo toàn tính kỵ nước.

Các thuật ngữ "đồng nhất" hoặc "độ đồng nhất" tính theo phần trăm, trong ngữ cảnh về hai trình tự polypeptit trở lên, dùng để chỉ hai trình tự hoặc tiểu trình tự trở lên mà giống nhau hoặc có tỉ lệ phần trăm xác định các gốc axit amin, *ví dụ,* ít nhất 60%, ít nhất 65%, ít nhất 70%, ít nhất 75%, ít nhất 80%, ít nhất 85%, ít nhất 90% hoặc ít nhất 95% hoặc lớn hơn, là giống nhau trên vùng xác định, khi được so sánh và xếp thẳng hàng để có sự giống nhau tối đa trên cửa sổ so sánh hoặc vùng được chỉ định như được đo bằng cách sử dụng thuật toán so sánh trình tự hoặc bằng cách xếp thẳng hàng thủ công và kiểm tra bằng mắt thường.

Để so sánh trình tự của các polypeptit, thông thường một trình tự axit amin đóng vai trò là trình tự tham chiếu, mà trình tự ứng viên được đem so sánh với. Việc xếp thẳng hàng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp khác nhau sẵn có đối với người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, *ví dụ,* phương pháp xếp thẳng hàng thị giác hoặc bằng cách sử dụng phần mềm sẵn có cho công chúng có sử dụng các thuật toán đã biết để đạt được mức xếp thẳng hàng tối đa. Các chương trình như vậy bao gồm các chương trình BLAST, ALIGN, ALIGN-2 (Genentech, South San Francisco, Calif.) hoặc Megalign (DNASTAR). Các thông số được sử dụng cho dạng xếp thẳng hàng để đạt được mức xếp thẳng hàng tối đa có thể được xác định bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Để so sánh trình tự của các trình tự polypeptit vì các mục đích của đơn này, protein BLAST tiêu chuẩn với thuật toán BLASTP dùng để xếp thẳng hàng hai trình tự protein với các thông số mặc định được sử dụng.

Thuật ngữ "đối tượng", "cá thể", và "bệnh nhân", như được sử dụng thay thế cho nhau trong bản mô tả này, đề cập đến động vật có vú, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở con người, động vật linh trưởng không phải người, động vật gặm nhấm (*ví dụ,* chuột cống,

chuột nhắt, và chuột lang nhà), thỏ, bò, lợn, ngựa, và các loài động vật có vú khác. Theo một phương án, bệnh nhân là người.

Các thuật ngữ "điều trị", "việc điều trị", và các thuật ngữ tương tự được sử dụng trong bản mô tả này có nghĩa chung chỉ việc thu được tác dụng dược lý học và/hoặc tác dụng sinh lý học mong muốn. "Điều trị" hoặc "việc điều trị" có thể được dùng để chỉ dấu hiệu nhận diện bất kỳ về sự thành công trong việc điều trị hoặc làm thuyên giảm bệnh thoái hóa thần kinh (*ví dụ,* bệnh Alzheimer hoặc bệnh thoái hóa thần kinh khác được mô tả trong bản mô tả này), bao gồm cả thông số chủ quan hoặc khách quan bất kỳ như sự suy yếu, sự thuyên giảm, sự cải thiện mức sống thêm của bệnh nhân, sự tăng về tỷ lệ hoặc thời gian sống thêm, sự giảm bớt triệu chứng hoặc làm cho bệnh này dễ chịu hơn đối với bệnh nhân, làm chậm tốc độ suy thoái hoặc sự suy giảm, hoặc cải thiện sự mạnh khỏe tâm thần hoặc thể chất của bệnh nhân. Việc điều trị hoặc làm thuyên giảm các triệu chứng có thể là dựa trên các thông số chủ quan hoặc khách quan. Tác dụng của sự điều trị có thể được so sánh với một cá thể hoặc nhóm các cá thể không tiếp nhận sự điều trị, hoặc với cùng một bệnh nhân trước khi điều trị hoặc ở một thời điểm khác trong suốt quá trình điều trị.

Thuật ngữ "tá dược dược dụng" đề cập đến thành phần dược không có hoạt tính mà tương hợp về mặt sinh học hoặc dược lý học để sử dụng ở người hoặc các động vật, như, nhưng không chỉ giới hạn ở, dung dịch đệm, chất mang, hoặc chất bảo quản.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "lượng trị liệu" hoặc "lượng hữu hiệu về mặt trị liệu" của một chất (*ví dụ,* kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này) là lượng của chất mà điều trị, làm nhẹ, giảm bớt hoặc làm giảm mức độ nghiêm trọng của các triệu chứng của bệnh của đối tượng. "Lượng trị liệu" của một chất (*ví dụ,* kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này) có thể cải thiện mức sống thêm của bệnh nhân, tăng thời gian hoặc tỷ lệ sống thêm, giảm các triệu chứng, làm cho chấn thương, bệnh hoặc tình trạng (*ví dụ,* bệnh thoái hóa thần kinh) dễ chịu hơn đối với bệnh nhân, làm chậm tốc độ suy thoái hoặc sự suy giảm, hoặc cải thiện sự mạnh khỏe tâm thần hoặc thể chất của bệnh nhân.

Thuật ngữ "cho dùng" được dùng để chỉ phương pháp phân phối các chất, hợp chất hoặc chế phẩm đến vị trí tác động sinh học mong muốn. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương pháp phân phối khu trú, phương pháp phân phối ngoài đường tiêu hóa, phương pháp phân phối trong tĩnh mạch, phương pháp phân phối trong da, phương pháp phân phối trong cơ, phương pháp phân phối trong nước của cột thần kinh, phương

pháp phân phối kết tràng, phương pháp phân phối trực tràng, hoặc phương pháp phân phối trong màng bụng. Theo một phương án, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này được cho dùng theo kiểu trong tĩnh mạch.

Thuật ngữ "đối chứng" hoặc "trị số đối chứng" đề cập đến trị số tham chiếu hoặc trị số đường cơ sở. Các đối chứng thích hợp có thể được xác định bởi người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này. Trong một số trường hợp, các trị số đối chứng có thể được xác định so với đường cơ sở trong cùng một đối tượng hoặc thử nghiệm, *ví dụ,* phép đo sTREM2 được thực hiện trước khi điều trị bằng kháng thể kháng TREM2 có thể là trị số đối chứng cho phép đo các mức sTREM2 sau điều trị trong cùng một đối tượng. Trong các trường hợp khác, trị số đối chứng có thể được xác định so với đối tượng đối chứng (*ví dụ,* đối chứng khỏe mạnh hoặc đối chứng bệnh) hoặc trị số trung bình trong một nhóm các đối tượng đối chứng (*ví dụ,* các đối chứng khỏe mạnh hoặc các đối chứng bệnh, *ví dụ,* nhóm gồm 10, 20, 50, 100, 200, 500, 1000 đối tượng đối chứng hoặc lớn hơn), *ví dụ,* phép đo mức sTREM2 của đối tượng ở thời điểm đường cơ sở hoặc sau khi điều trị có thể được so sánh với trị số đối chứng của đối tượng khỏe mạnh.

III. KHÁNG THỂ KHÁNG TREM2

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các kháng thể mà liên kết đặc hiệu với protein TREM2. Theo một số phương án, kháng thể này liên kết đặc hiệu với protein TREM2 người. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 là chọn lọc đối với TREM2 so với các thụ thể tương tự TREM khác (*ví dụ,* TREM1).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 là kháng thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự vùng quyết định bổ sung (CDR), vùng biến đổi chuỗi nặng, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được bộc lộ trong bản mô tả này. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm một hoặc nhiều trình tự CDR, vùng biến đổi chuỗi nặng, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như được bộc lộ trong bản mô tả này và bao gồm thêm một hoặc nhiều đặc điểm chức năng như được bộc lộ trong bản mô tả này, *ví dụ,* kháng thể mà tăng cường hoạt tính TREM2 (*ví dụ,* tăng cường khả năng thực bào, hoặc tăng cường khả năng di chuyển, biệt hóa, chức năng hoặc khả năng sống sót của tế bào như tế bào tủy, vi tế bào thần kinh đệm, hoặc đại thực bào) hoặc kháng thể mà làm giảm mức sTREM2. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm polypeptit Fc mà bao gồm một hoặc nhiều dạng cải biến như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 là kháng thể thể khảm. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 là kháng thể được làm tương thích với người và/hoặc kháng thể được làm trưởng thành về ái lực.

Trình tự kháng thể kháng TREM2

Theo một số phương án, trình tự chuỗi nặng, hoặc một phần của nó, và/hoặc trình tự chuỗi nhẹ, hoặc một phần của nó, được lấy từ kháng thể kháng TREM2 được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* Dòng CL0020306, Dòng CL0020188, hoặc Dòng CL0020307). CDR, các trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ của các dòng này được nêu ra trong Bảng 8.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm một hoặc nhiều CDR được chọn lựa từ nhóm gồm:

(a) trình tự CDR1 chuỗi nặng (CDR-H1) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:4 và 12, hoặc có đến hai dạng thay thế axit amin so với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:4 và 12;

(b) trình tự CDR2 chuỗi nặng (CDR-H2) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:5, 13, và 25, hoặc có đến hai dạng thay thế axit amin so với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:5, 13, và 25;

(c) trình tự CDR3 chuỗi nặng (CDR-H3) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:6, 14, và 17, hoặc có đến hai dạng thay thế axit amin so với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:6, 14, và 17;

(d) trình tự CDR1 chuỗi nhẹ (CDR-L1) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:7 và 23, hoặc có đến hai dạng thay thế axit amin so với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:7 và 23;

(e) trình tự CDR2 chuỗi nhẹ (CDR-L2) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, hoặc có đến hai dạng thay thế axit amin so với trình tự axit amin của SEQ ID NO:8; và

(f) trình tự CDR3 chuỗi nhẹ (CDR-L3) có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:9 và 18, hoặc có đến hai dạng thay thế axit amin so với trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:9 và 18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm hai, ba, bốn, năm, hoặc tất cả sáu trình tự trong số các trình tự (a)-(f). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm CDR-H1 của (a), CDR-H2 của (b), và CDR-H3 của (c). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm CDR-L1 của (d), CDR-L2 của (e), và CDR-L3 của (f). Theo một số phương án, CDR có đến hai dạng thế axit amin có một dạng thế axit amin so với trình tự tham chiếu. Theo một số phương án, CDR có đến hai dạng thế axit amin có hai dạng thế axit amin so với trình tự tham chiếu. Theo một số phương án, đến hai dạng thế axit amin này là các dạng thế bảo tồn.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm một hoặc nhiều CDR được chọn lựa từ nhóm gồm:

(a) trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:4 và 12;

(b) trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:5, 13, và 25;

(c) trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:6, 14, và 17;

(d) trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:7 và 23;

(e) trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8; và

(f) trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:9 và 18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm hai, ba, bốn, năm, hoặc tất cả sáu trình tự trong số các trình tự (a)-(f). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm CDR-H1 của (a), CDR-H2 của (b), và CDR-H3 của (c). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm CDR-L1 của (d), CDR-L2 của (e), và CDR-L3 của (f).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm:

(a) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18; hoặc

(b) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:23, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18; hoặc

(c) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18; hoặc

(d) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:23, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18; hoặc

(e) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9; hoặc

(f) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:12, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:13, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:14, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9; hoặc

(g) CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, và 26. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, và 26.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, và 27. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, và 27.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, và 26, vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, và 27. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm: vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, và 26, và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, và 27.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm:

(a) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:2 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:3; hoặc

(b) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:10 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:11; hoặc

(c) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:15 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:16; hoặc

(d) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:19 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:20; hoặc

(e) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:21 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:20; hoặc

(f) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:19 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:22; hoặc

(g) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:21 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:22; hoặc

(h) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:24 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:20; hoặc

(i) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:26 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:20; hoặc

(j) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:24 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:22; hoặc

(k) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:26 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:22; hoặc

(l) trình tự V_H mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:24 và trình tự V_L có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO:27.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm một hoặc nhiều trình tự được bao gồm bởi trình tự liên ứng được bộc lộ trong bản mô tả này. Ví dụ không giới hạn phạm vi sáng chế là các trình tự liên ứng có thể được xác định bằng cách xếp thẳng hàng các trình tự chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ (*ví dụ,* các CDR) của các kháng thể từ các dòng mầm giống nhau (hoặc tương tự). Theo một số phương án, các trình tự liên ứng có thể được tạo ra từ các kháng thể chứa các trình tự có độ dài giống nhau (hoặc tương tự) và/hoặc có ít nhất một CDR tương tự ở mức cao (*ví dụ,* CDR3 tương tự ở mức cao). Theo một số phương án, các trình tự như vậy trong các kháng thể này có thể được xếp thẳng hàng và so sánh để xác định các mô típ hoặc các axit amin được bảo tồn (*tức là*, trong đó sự thay đổi trình tự có thể làm thay đổi chức năng của protein) và/hoặc các vùng xảy ra sự biến đổi các trình tự (*tức là* trong đó sự biến đổi trình tự không có khả năng ảnh hưởng đáng kể đến chức năng của protein). Ngoài ra, các trình tự liên ứng có thể được xác định bằng cách xếp thẳng

hàng các trình tự chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ (*ví dụ,* các CDR) của các kháng thể mà liên kết với các epitop giống hoặc tương tự nhau *(ví dụ,* chồng lấn) để xác định các mô típ hoặc các axit amin được bảo tồn (*ví dụ,* trong đó sự thay đổi về các trình tự có thể làm thay đổi chức năng của protein) và các vùng mà xảy ra sự biến đổi ở dạng xếp thẳng hàng các trình tự (*tức là* trong đó sự biến đổi của trình tự không có khả năng ảnh hưởng đáng kể đến chức năng của protein). Theo một số phương án, một hoặc nhiều trình tự liên ứng có thể được xác định đối với các kháng thể mà nhận biết epitop giống hoặc tương tự như kháng thể kháng TREM2 như được bộc lộ trong bản mô tả này. Trình tự liên ứng lấy làm ví dụ bao gồm các SEQ ID NO: 28-32. Trong các trình tự liên ứng của các SEQ ID NO:28-32, chữ cái viết hoa thể hiện gốc axit amin được bảo toàn tuyệt đối giữa các trình tự được xếp thẳng hàng (*ví dụ, trình* tự CDR được xếp thẳng hàng), trong khi chữ "X" hoặc chữ cái Hy Lạp (*ví dụ,* "α", "β", "γ", "δ", "ε", hoặc "φ") thể hiện gốc axit amin không được bảo toàn tuyệt đối giữa các trình tự được xếp thẳng hàng. Sẽ nhận thấy rằng, khi chọn một axit amin để gắn xen vào một vị trí được đánh dấu bằng chữ "X" hoặc bằng một chữ cái Hy Lạp, theo một số phương án, axit amin này được chọn từ những axit amin được tìm thấy ở vị trí tương ứng trong trình tự được xếp thẳng hàng.

Các dòng CL0020188, CL0020306, CL0020307, và các biến thể của CL0020188

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm:

(a) trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự của G-F-T-F-T-α_6-F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), trong đó α_6 là D hoặc N;

(b) trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự của V-I-R-N-β_5-β_6-N-β_8-Y-T-β_{11}-β_{12}-Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), trong đó β_5 là K hoặc R; β_6 là A hoặc P; β_8 là G hoặc A;□β_{11} là A hoặc T; và β_{12} là G hoặc D;

(c) trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự của γ_1-R-L-γ_4-Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), trong đó γ_1 là A hoặc T; và γ_4 là T hoặc S;

(d) trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự của Q-S-S-K-S-L-L-H-S-δ_{10}-G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), trong đó δ_{10} là N hoặc T;

(e) trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự của WMSTRAS (SEQ ID NO:8); và

(f) trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự của Q-Q-F-L-E-ϕ_6-P-F-T (SEQ ID NO:32), trong đó ϕ_6 là Y hoặc F.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-H1 mà được chọn lựa từ các SEQ ID NO:4 và 12. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-H2 mà được chọn lựa từ các SEQ ID NO:5, 13, và 25. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-H3 mà được chọn lựa từ các SEQ ID NO:6, 14, và 17. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-L1 mà được chọn lựa từ các SEQ ID NO:7 và 23. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-L3 được chọn lựa từ các SEQ ID NO:9 và 18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, và 26. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:2, 10, 15, 19, 21, 24, và 26.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, và 27. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:3, 11, 16, 20, 22, và 27.

Dòng CL0020188

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:15. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:15.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:16. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:16.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:16. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:16.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:4, 5, và 17, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:15. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:7, 8, và 18, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:16.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 cạnh tranh để liên kết với kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* kháng thể bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng và CDR1-3 chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:4, 5, 17, 7, 8, và 18, hoặc kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:15 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:16).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:23, trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự axit

amin của SEQ ID NO:8, và trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:24.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:24 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:22. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:24 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng lần lượt bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO:4, 25, và 17, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nhẹ lần lượt bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO:23, 8, và 18, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:22.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên cạnh tranh để liên kết với kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* kháng thể bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng và CDR1-3 chuỗi nhẹ lần lượt bao gồm các trình tự axit amin

của các SEQ ID NO:4, 25, 17, 23, 8, và 18, hoặc kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:24 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:22).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:24. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:24.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:27. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:27.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:24 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:27. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:24 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:27.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng lần lượt bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO:4, 25, và 17, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:24. Theo một số

phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nhẹ lần lượt bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO:7, 8, và 9, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 95%, hoặc 97%) với SEQ ID NO:27.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên là kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* kháng thể bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng và CDR1-3 chuỗi nhẹ lần lượt bao gồm các trình tự axit amin của các SEQ ID NO:4, 25, 17, 7, 8, và 9, hoặc kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:24 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:27).

Dòng CL0020306

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:5, trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:6, trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,*

ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:3. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:4, 5, và 6, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:2. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:7, 8, và 9, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:3.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 cạnh tranh để liên kết với kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* kháng thể bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng và CDR1-3 chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:4, 5, 6, 7, 8, và 9, hoặc kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:3).

Dòng CL0020307

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:12, trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:13, trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:14, trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:7, trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:9.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% (*ví dụ,* độ đồng nhất trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 hoặc phần liên kết kháng nguyên bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:10.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:11.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:11. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:11.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:12, 13, và 14, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:10. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ mà bao gồm CDR1-3 chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:7, 8, và 9, và có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với SEQ ID NO:11.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 là kháng thể mà cạnh tranh để liên kết với kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* kháng thể bao gồm CDR1-3 chuỗi nặng và CDR1-3 chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự axit amin lần lượt của các SEQ ID NO:12, 13, 14, 7, 8, và 9, hoặc kháng thể bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:10 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:11).

Các đặc điểm liên kết của kháng thể kháng TREM2

Theo một số phương án, kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này mà liên kết đặc hiệu với protein TREM2 thì liên kết với TREM2 mà được biểu hiện trên tế bào (*ví dụ,* tế bào hoặc dòng tế bào sơ cấp mà biểu hiện TREM2 theo kiểu nội sinh, như các đại thực bào

người, hoặc tế bào hoặc dòng tế bào sơ cấp mà được thao tác về mặt gen để biểu hiện TREM2, *ví dụ,* như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây). Theo một số phương án, kháng thể mà liên kết đặc hiệu với protein TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này thì liên kết với protein TREM2 đã tinh chế hoặc tái tổ hợp hoặc một phần của nó, hoặc với protein thể khảm bao gồm TREM2 hoặc một phần của nó (*ví dụ,* protein dung hợp Fc bao gồm TREM2 hoặc protein dung hợp Fc bao gồm các miền kéo dài sang ngoại bào của TREM2).

Theo một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với protein TREM2 người thể hiện khả năng phản ứng chéo với một hoặc nhiều protein TREM2 khác của một loài khác. Theo một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với protein TREM2 người thể hiện khả năng phản ứng chéo với protein TREM2 của khỉ đuôi dài ("cyno"). Theo một số phương án, kháng thể liên kết đặc hiệu với protein TREM2 người thể hiện khả năng phản ứng chéo với protein TREM2 của chuột. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 thể hiện khả năng phản ứng chéo với TREM2 người, TREM2 cyno, và TREM2 chuột.

Các phương pháp để phân tích ái lực liên kết, động học liên kết, và khả năng phản ứng chéo đã được biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các thử nghiệm liên kết pha rắn (*ví dụ,* thử nghiệm ELISA), kết tủa miễn dịch, cộng hưởng plasmon bề mặt (*ví dụ,* Biacore™ (GE Healthcare, Piscataway, NJ)), các thử nghiệm loại trừ động học (*ví dụ,* KinExA®), đếm tế bào theo dòng chảy, phân loại tế bào được hoạt hóa bằng huỳnh quang (FACS), phân tích giao thoa lớp sinh học (*ví dụ,* Octet™ (FortéBio, Inc., Menlo Park, CA)), và phân tích thẩm tách miễn dịch phương Tây. Theo một số phương án, ELISA được sử dụng để xác định ái lực liên kết và/hoặc khả năng phản ứng chéo. Các phương pháp để thực hiện các thử nghiệm ELISA đã được biết trong lĩnh vực này, và cũng được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây. Theo một số phương án, cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được sử dụng để xác định ái lực liên kết, động học liên kết, và/hoặc khả năng phản ứng chéo. Theo một số phương án, các thử nghiệm loại trừ động học được sử dụng để xác định ái lực liên kết, động học liên kết, và/hoặc khả năng phản ứng chéo. Theo một số phương án, các thử nghiệm phân tích giao thoa lớp sinh học được sử dụng để xác định ái lực liên kết, động học liên kết, và/hoặc khả năng phản ứng chéo.

Các epitop được nhận biết bởi các kháng thể kháng TREM2

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 nhận biết epitop của TREM2 người giống hoặc về cơ bản giống với epitop được nhận biết bởi dòng kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này. Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "về cơ bản giống", như được sử dụng liên quan đến epitop được nhận biết bởi dòng kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này, có nghĩa là kháng thể kháng TREM2 nhận biết epitop mà tương đồng, nằm trong, hoặc gần tương đồng (*ví dụ,* có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90% với, hoặc có một, hai hoặc ba dạng thế axit amin, *ví dụ,* các dạng thế bảo tồn, so với), hoặc có mức chồng lấn cơ bản với (*ví dụ,* chồng lấn ít nhất là 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, hoặc 95% với) epitop được nhận biết bởi dòng kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 nhận biết epitop của TREM2 người giống hoặc về cơ bản giống với epitop được nhận biết bởi dòng kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm Dòng CL0020306, Dòng CL0020188, Dòng CL0020307, và các biến thể của những dòng này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 liên kết với TREM2 người ở epitop trong vùng thân của TREM2. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 nhận biết epitop của TREM2 người bao gồm, ở trong, hoặc gồm có các gốc 129-172 hoặc các gốc 131-169 của SEQ ID NO:1. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 nhận biết epitop của TREM2 người bao gồm, ở trong, hoặc gồm có các gốc 129-148 của SEQ ID NO:1 (*ví dụ,* 143-148 của SEQ ID NO:1). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 là chất chủ vận mà hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu TREM2/DAP12 (*ví dụ,* bằng cách kích thích phản ứng phosphoryl hóa của kinaza như Syk) và liên kết với TREM2 người ở epitop trong vùng thân của TREM2. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 liên kết với TREM2 người ở epitop trong vùng thân của TREM2 và ức chế sự phân cắt TREM2 bởi proteaza (*ví dụ,* ADAM17).

Các đặc điểm chức năng của các kháng thể kháng TREM2

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 (*ví dụ,* kháng thể có một hoặc nhiều trình tự CDR, vùng biến đổi chuỗi nặng, và/hoặc vùng biến đổi chuỗi nhẹ như đã được bộc lộ) hoạt động với một hoặc nhiều hoạt tính TREM2 như được bộc lộ trong bản mô tả này. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 điều biến các mức protein sTREM2 (*ví dụ,* các mức sTREM2 mà được lột bỏ khỏi bề mặt tế bào đi vào mẫu ngoại

bào), điều biến quá trình thu nạp hoặc quá trình phosphoryl hóa của kinaza mà tương tác với phức hợp truyền tín hiệu TREM2/DAP12 (*ví dụ,* kinaza Syk), và/hoặc điều biến một hoặc nhiều hoạt tính phía cuối nguồn của phức hợp truyền tín hiệu, như khả năng thực bào, tăng trưởng của tế bào, sống sót của tế bào, biệt hóa của tế bào, tiết xytokin, hoặc khả năng di chuyển của tế bào.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường một hoặc nhiều hoạt tính TREM2 (*ví dụ,* các hoạt tính được mô tả trong bản mô tả này) mà được kích thích bởi phối tử. Theo một số phương án, phối tử này là phối tử lipit. Các ví dụ về các phối tử lipit của TREM2 bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 1-palmitoyl-2-(5'-oxo-valeroyl)-sn-glyxero-3-phosphocholin (POVPC), 2-Arachidonoylglyxerol (2-AG), 7-ketocholesterol (7-KC), 24(S)hydroxycholesterol (24OHC), 25(S)hydroxycholesterol (25OHC), 27-hydroxycholesterol (27OHC), Axyl Carnitin (AC), alkylaxylglyxerophosphocholin (PAF), α-galactosylxeramit (KRN7000), Bis(monoaxylglyxero)phosphat (BMP), Cardiolipin (CL), Xeramit, Xeramit-1-phosphat (C1P), Cholesteryl este (CE), Cholesterol phosphat (CP), Diaxylglyxerol 34:1 (DG 34:1), Diaxylglyxerol 38:4 (DG 38:4), Diaxylglyxerol pyrophosphat (DGPP), Dihyrdoxeramit (DhCer), Dihydrosphingomyelin (DhSM), Ete phosphatidylcholin (PCe), cholesterol tự do (FC), Galactosylxeramit (GalCer), Galactosylsphingosin (GalSo), Ganglioside GM1, Ganglioside GM3, Glucosylsphingosin (GlcSo), Dung dịch muối được cân bằng của Hank (HBSS), Kdo2-Lipit A (KLA), Lactosylxeramit (LacCer), lysoalkylaxylglyxerophosphocholin (LPAF), Axit Lysophosphatidic (LPA), Lysophosphatidylcholin (LPC), Lysophosphatidyletanolamin (LPE), Lysophosphatidylglyxerol (LPG), Lysophosphatidylinositol (LPI), Lysosphingomyelin (LSM), Lysophosphatidylserin (LPS), N-Axyl-phosphatidyletanolamin (NAPE), N-Axyl-Serin (NSer), Phosphatidylcholin được oxy hóa (oxPC), Axit palmitic-axit 9-hydroxy-stearic (PAHSA), Phosphatidyletanolamin (PE), Phosphatidyletanol (PEtOH), Axit Phosphatidic (PA), Phosphatidylcholin (PC), Phosphatidylglyxerol (PG), Phosphatidylinositol (PI), Phosphatidylserin (PS), Sphinganin, Sphinganin-1-phosphat (Sa1P), Sphingomyelin (SM), Sphingosin, Sphingosin-1-phosphat (So1P), và Sulfatit.

Điều biến mức lột bỏ sTREM2

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 làm thay đổi các mức protein sTREM2 trong mẫu, *ví dụ,* các mức sTREM2 mà được lột bỏ khỏi bề mặt tế bào đi vào mẫu ngoại bào. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 làm giảm mức sTREM2.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 làm giảm mức sTREM2 nếu lượng sTREM2 trong mẫu đã xử lý bị giảm ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc lớn hơn so với trị số đối chứng. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 làm giảm mức sTREM2 nếu lượng sTREM2 trong mẫu đã xử lý bị giảm ít nhất 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần hoặc lớn hơn so với trị số đối chứng. Theo một số phương án, trị số đối chứng là lượng sTREM2 trong mẫu không được xử lý (*ví dụ,* dịch nổi từ tế bào biểu hiện TREM2 mà không được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2, hoặc mẫu từ đối tượng mà không được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2) hoặc mẫu được xử lý bằng kháng thể không liên kết với TREM2 thích hợp.

Theo một số phương án, mức lột bỏ sTREM2 được đo bằng cách sử dụng mẫu bao gồm dịch cơ thể, *ví dụ,* máu, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, hoặc dịch não tủy. Theo một số phương án, mẫu này là dịch não tủy. Theo một số phương án, mẫu này là dịch nổi từ các dịch nuôi cấy tế bào (*ví dụ,* dịch nổi từ tế bào hoặc dòng tế bào sơ cấp mà biểu hiện TREM2 theo kiểu nội sinh, như các đại thực bào người, hoặc tế bào hoặc dòng tế bào sơ cấp mà được thao tác về mặt gen để biểu hiện TREM2, *ví dụ,* như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây).

Theo một số phương án, mức sTREM2 trong mẫu được đo bằng cách sử dụng các thử nghiệm miễn dịch. Các thử nghiệm miễn dịch đã được biết trong lĩnh vực này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA) như các thử nghiệm miễn dịch nhân lên nhiều enzym (EMIA), thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch enzym vi hạt (MEIA), hóa học mô miễn dịch (IHC), hóa học tế bào miễn dịch, các thử nghiệm miễn dịch điện di mao quản (CEIA), các thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), các thử nghiệm miễn dịch phát quang hóa học, huỳnh quang miễn dịch (CL), và các thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang (ECL). Theo một số phương án, các mức sTREM2 được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA. Theo một số phương

án, các mức sTREM2 được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm ELISA như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Điều biến quá trình thu nạp hoặc phosphoryl hóa kinaza

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 kích thích quá trình phosphoryl hóa kinaza mà tương tác với phức hợp truyền tín hiệu TREM2/DAP12 (như, nhưng không giới hạn ở, Syk, ZAP70, PI3K, Erk, AKT, hoặc GSK3b). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 kích thích quá trình phosphoryl hóa kinaza mà tương tác với phức hợp truyền tín hiệu TREM2/DAP12 mà không phong bế khả năng liên kết của phối tử TREM2 nguyên thể. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường mức phosphoryl hóa kinaza mà tương tác với phức hợp truyền tín hiệu TREM2/DAP12 mà được kích thích bởi phối tử TREM2 (*ví dụ,* phối tử lipit). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 kích thích hoặc tăng cường mức phosphoryl hóa Syk. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 kích thích hoặc tăng cường mức phosphoryl hóa Syk nếu mức phosphoryl hóa Syk trong mẫu được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2 tăng ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc lớn hơn so với trị số đối chứng. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 kích thích quá trình phosphoryl hóa Syk nếu mức Syk phosphoryl hóa trong mẫu được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2 tăng ít nhất 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, hoặc lớn hơn so với trị số đối chứng. Theo một số phương án, trị số đối chứng là mức phosphoryl hóa Syk trong mẫu không được xử lý (*ví dụ,* mẫu bao gồm tế bào biểu hiện TREM2 mà không được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2, hoặc mẫu từ đối tượng mà không được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2), hoặc mẫu mà được xử lý bằng phối tử TREM2 mà không phải là kháng thể kháng TREM2, hoặc mẫu được xử lý bằng kháng thể không liên kết với TREM2 thích hợp.

Để phát hiện và/hoặc định lượng mức phosphoryl hóa (*ví dụ,* mức phosphoryl hóa Syk) trong mẫu, theo một số phương án, thử nghiệm miễn dịch được sử dụng. Theo một số phương án, thử nghiệm miễn dịch này là thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch nhân lên nhiều enzym (EMIA), thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch enzym vi hạt (MEIA), hóa học mô miễn dịch (IHC), hóa học tế bào miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch điện di mao quản (CEIA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang hóa học, huỳnh quang miễn dịch

(CL), hoặc thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang (ECL). Theo một số phương án, mức phosphoryl hóa được phát hiện và/hoặc định lượng bằng cách sử dụng thử nghiệm miễn dịch mà sử dụng thử nghiệm đồng nhất lân cận phát quang khuếch đại (AlphaLISA®, PerkinElmer Inc.).

Theo một số phương án, mức phosphoryl hóa được đo bằng cách sử dụng mẫu mà bao gồm một hoặc nhiều tế bào, *ví dụ,* một hoặc nhiều tế bào biểu hiện TREM2 (*ví dụ,* tế bào hoặc dòng tế bào sơ cấp mà biểu hiện TREM2 theo kiểu nội sinh, như các đại thực bào người hoặc vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC, hoặc tế bào hoặc dòng tế bào sơ cấp mà được thao tác về mặt gen để biểu hiện TREM2, *ví dụ,* như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây). Theo một số phương án, mẫu này là dịch cơ thể, *ví dụ,* máu, huyết tương, huyết thanh, nước tiểu, hoặc dịch não tủy. Theo một số phương án, mẫu này là mô (*ví dụ,* phổi, não, thận, lá lách, mô thần kinh hoặc cơ xương) hoặc các tế bào từ mô như vậy. Theo một số phương án, mẫu này là dịch, mô, hoặc các tế bào nội sinh (*ví dụ,* từ người hoặc đối tượng không phải người).

Điều biến khả năng thực bào

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng thực bào mảnh vỡ tế bào chết, mảnh vỡ mô, hạt dạng tinh bột beta, hoặc chất liệu ngoại lai. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng thực bào mà không phong bế khả năng liên kết của phối tử TREM2 nguyên thể. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng thực bào mà được kích thích bởi phối tử TREM2 (*ví dụ,* phối tử lipit). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng thực bào nếu mức thực bào trong mẫu được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2 tăng ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc lớn hơn so với trị số đối chứng. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng thực bào nếu mức thực bào trong mẫu được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2 tăng ít nhất 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, hoặc lớn hơn so với trị số đối chứng. Theo một số phương án, trị số đối chứng là mức thực bào trong mẫu không được xử lý, mẫu mà được xử lý bằng phối tử TREM2 nhưng không phải kháng thể kháng TREM2, hoặc mẫu được xử lý bằng kháng thể không liên kết với TREM2 thích hợp.

Theo một số phương án, mức thực bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm thực bào với cơ chất được đánh dấu. Các thử nghiệm thực bào đã được biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, thử nghiệm thực bào được thực hiện trên mẫu bao gồm các tế bào biểu hiện TREM2 theo kiểu nội sinh, như các đại thực bào người hoặc vi tế bào thần kinh đệm. Theo một số phương án, thử nghiệm thực bào được thực hiện trên mẫu bao gồm các tế bào đã được thao tác về mặt gen để biểu hiện TREM2. Theo một số phương án, mức thực bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm thực bào đại thực bào ở người như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Điều biến quá trình biệt hóa, chức năng, di chuyển, và sống sót của tế bào

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển của tế bào, khả năng sống sót của tế bào, chức năng của tế bào, hoặc khả năng biệt hóa của tế bào (*ví dụ,* đối với các tế bào tủy, các đại thực bào, và vi tế bào thần kinh đệm, bao gồm vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC và vi tế bào thần kinh đệm gắn liền với bệnh). Vi tế bào thần kinh đệm gắn liền với bệnh và các phương pháp phát hiện vi tế bào thần kinh đệm gắn liền với bệnh được mô tả trong Keren-Shaul *và đồng tác giả*, *Cell*, 2017, 169:1276-1290. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển của tế bào của một hoặc nhiều loại tế bào (*ví dụ,* các tế bào tủy, các đại thực bào, hoặc vi tế bào thần kinh đệm). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng sống sót của tế bào của một hoặc nhiều loại tế bào (*ví dụ,* các tế bào tủy, các đại thực bào, hoặc vi tế bào thần kinh đệm). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường chức năng của tế bào của một hoặc nhiều loại tế bào (*ví dụ,* các tế bào tủy, các đại thực bào, hoặc vi tế bào thần kinh đệm). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng biệt hóa của tế bào của một hoặc nhiều loại tế bào (*ví dụ,* các tế bào tủy, các đại thực bào, hoặc vi tế bào thần kinh đệm). Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển, sống sót, chức năng và/hoặc biệt hóa của các tế bào tủy. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển, sống sót, chức năng và/hoặc biệt hóa của các đại thực bào. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển, sống sót, chức năng và/hoặc biệt hóa của vi tế bào thần kinh đệm. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng hoạt hóa của vi tế bào thần kinh đệm. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển, sống sót, chức năng và/hoặc biệt hóa của vi tế bào thần kinh đệm gắn liền với bệnh. Theo một số phương án, kháng thể kháng

TREM2 tăng cường khả năng di chuyển của tế bào, sống sót của tế bào, chức năng của tế bào, hoặc biệt hóa của tế bào mà không phong bế khả năng liên kết của phối tử TREM2 nguyên thể. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển của tế bào, sống sót của tế bào, chức năng của tế bào, hoặc biệt hóa của tế bào mà được kích thích bởi phối tử TREM2 (*ví dụ,* phối tử lipit).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển của tế bào, sống sót của tế bào, chức năng của tế bào, hoặc biệt hóa của tế bào nếu mức hoạt tính (*ví dụ,* mức di chuyển, sống sót, chức năng và/hoặc biệt hóa) trong mẫu được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2 tăng ít nhất 10%, ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90% hoặc lớn hơn so với trị số đối chứng. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường khả năng di chuyển của tế bào, sống sót của tế bào, chức năng của tế bào, hoặc biệt hóa của tế bào nếu mức hoạt tính (*ví dụ,* mức di chuyển, sống sót, chức năng và/hoặc biệt hóa) trong mẫu được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2 tăng ít nhất 2 lần, 3 lần, 4 lần, 5 lần, 6 lần, 7 lần, 8 lần, 9 lần, 10 lần, hoặc lớn hơn so với trị số đối chứng. Theo một số phương án, trị số đối chứng là mức hoạt tính (*ví dụ,* mức di chuyển, sống sót, chức năng và/hoặc biệt hóa) trong mẫu không được xử lý (*ví dụ,* mẫu mà không được xử lý bằng kháng thể kháng TREM2), mẫu mà được xử lý bằng phối tử TREM2 mà không phải là kháng thể kháng TREM2, hoặc mẫu được xử lý bằng kháng thể không liên kết với TREM2 thích hợp.

Theo một số phương án, khả năng di chuyển của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm hóa ứng động. Các thử nghiệm hóa ứng động đã được biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, thử nghiệm khả năng di chuyển của tế bào (*ví dụ,* thử nghiệm hóa ứng động) được thực hiện trên mẫu bao gồm các tế bào biểu hiện TREM2 theo kiểu nội sinh, như các đại thực bào người. Theo một số phương án, thử nghiệm khả năng di chuyển của tế bào (*ví dụ,* thử nghiệm hóa ứng động) được thực hiện trên mẫu bao gồm các tế bào đã được thao tác về mặt gen để biểu hiện TREM2. Theo một số phương án, khả năng di chuyển của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm hóa ứng động đại thực bào người như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Theo một số phương án, khả năng sống sót của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm về khả năng sống sót của tế bào. Thử nghiệm về khả năng sống sót của các tế bào đã được biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, thử nghiệm về khả năng sống sót

của tế bào (*ví dụ,* thử nghiệm về khả năng sống của tế bào) được thực hiện trên mẫu bao gồm các tế bào biểu hiện TREM2 theo kiểu nội sinh, như các đại thực bào người. Theo một số phương án, thử nghiệm về khả năng sống sót của tế bào (*ví dụ,* thử nghiệm về khả năng sống của tế bào) được thực hiện trên mẫu bao gồm các tế bào đã được thao tác về mặt gen để biểu hiện TREM2. Theo một số phương án, khả năng sống sót của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm về khả năng sống của đại thực bào người như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Theo một số phương án, chức năng của tế bào được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm chức năng mà thích hợp cho tế bào đó. Ví dụ, theo một số phương án, chức năng của tế bào đại thực bào được đánh giá bằng cach sử dụng thử nghiệm thực bào, *ví dụ,* như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Theo một số phương án, mức biệt hóa của tế bào được đo bằng cách đánh giá khả năng các tế bào biểu hiện TREM2 theo kiểu nội sinh để biệt hóa. Ví dụ, theo một số phương án, mức biệt hóa của tế bào được đo bằng cách đánh giá khả năng các đại thực bào biệt hóa từ bạch cầu đơn nhân to, *ví dụ,* như được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Theo một số phương án, khả năng hoạt hóa vi tế bào thần kinh đệm được đo *in vivo*. Theo một số phương án, khả năng hoạt hóa vi tế bào thần kinh đệm được đo bằng cách sử dụng phương pháp hình ảnh TSPO-PET. Các phương pháp hình ảnh TSPO-PET đã được biết trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 tăng cường chức năng của vi tế bào thần kinh đệm mà không làm tăng chứng viêm thần kinh. Mức độ viêm thần kinh có thể được xác định bằng cách đo các mức xytokin (*ví dụ,* các xytokin gây viêm), như, nhưng không giới hạn ở, TNF-α, IL-1β, IL-6, IL-1ra, TGFβ, IL-15, hoặc IFN-γ. Theo một số phương án, các mức xytokin này được đo bằng cách sử dụng các thử nghiệm miễn dịch, *ví dụ,* thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch nhân lên nhiều enzym (EMIA), thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm miễn dịch enzym vi hạt (MEIA), hóa học mô miễn dịch (IHC), hóa học tế bào miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch điện di mao quản (CEIA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), thử nghiệm miễn dịch phát quang hóa học, huỳnh quang miễn dịch (CL), hoặc thử nghiệm miễn dịch điện hóa phát quang (ECL).

IV. CÁC ĐỘT BIẾN POLYPEPTIT FC CỦA PROTEIN CÓ PHẦN LIÊN KẾT KHÁNG NGUYÊN KHÁNG TREM2

Theo một số khía cạnh, kháng thể kháng TREM2 bao gồm hai polypeptit Fc, một hoặc cả hai trong số chúng mà mỗi polypeptit Fc này bao gồm các dạng cải biến được chọn lựa một cách độc lập (*ví dụ,* các đột biến) hoặc có thể là polypeptit Fc kiểu hoang, *ví dụ,* polypeptit Fc IgG1 của người. Các ví dụ không giới hạn về đột biến mà có thể được đưa vào một hoặc cả hai polypeptit Fc bao gồm, *ví dụ,* các đột biến để cho phép liên kết polypeptit Fc (hoặc kháng thể bao gồm phần này) vào thụ thể BBB, như protein thụ thể transferin (TfR) (*ví dụ,* TfR của người hoặc khỉ đuôi dài, như có thể được biểu hiện trên tế bào nội mạc não), các đột biến để làm tăng tính ổn định huyết thanh, để điều biến chức năng tác động, để làm ảnh hưởng đến quá trình glycosyl hóa, để làm giảm tính sinh miễn dịch ở người, và/hoặc để đem lại dạng heterodime hóa chốt và lỗ của polypeptit Fc.

Các đột biến liên kết thụ thể transferin

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm polypeptit Fc mà bao gồm dạng cải biến (*ví dụ,* dạng thay thế axit amin) mà cho phép liên kết polypeptit Fc vào protein TfR. Nói một cách vắn tắt, khả năng liên kết vào protein TfR (*ví dụ,* vào miền đỉnh của nó) mà được biểu hiện trên, ví dụ, tế bào nội mạc não, theo một số phương án, có thể cho phép polypeptit Fc được cải biến theo sáng chế này hoặc kháng thể bao gồm polypeptit Fc được cải biến này băng qua hàng rào máu-não thông qua hiện tượng vận chuyển xuyên tế bào do thụ thể làm trung gian. Theo các phương án nhất định, hiện tượng vận chuyển xuyên tế bào do thụ thể làm trung gian có thể tăng cường hoặc cải thiện khả năng của protein bao gồm polypeptit Fc trong việc có mặt ở não (*tức là,* ở phía lòng ống của hàng rào máu-não), điều này có thể cho phép có được khả năng liên kết được cải thiện vào TREM2 trong hệ thần kinh trung ương, và các chức năng khác, *ví dụ,* chức năng thanh thải, trung hòa, hoặc làm tiêu tan bằng miễn dịch của đích, hoặc các chức năng tương tự.

Các dạng cải biến axit amin liên kết TfR làm ví dụ đối với Fc (*ví dụ,* phần, mảnh, hoặc miền CH2 và/hoặc CH3), và polypeptit Fc và các phần của chúng mà bao gồm các dạng cải biến axit amin, được mô tả trong tài liệu: công bố bằng sáng chế PCT số WO 2018/152326A1. Các dạng cải biến axit amin này, trình tự polypeptit Fc liên kết TfR và polypeptit Fc liên kết TfR, và các kỹ thuật dùng để tạo ra và kiểm tra dạng này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Một hoặc hai polypeptit Fc của dime Fc theo sáng chế

này có thể được thao tác để bao gồm dạng cải biến để cho phép liên kết vào TfR. Theo các phương án nhất định, một polypeptit Fc của dime Fc bao gồm dạng cải biến để cho phép liên kết vào TfR, và polypeptit Fc kia thì không.

Theo một số phương án, polypeptit Fc được cải biến bao gồm mô típ YxTEWSS (SEQ ID NO:58). Theo một số phương án, polypeptit Fc được cải biến bao gồm mô típ TxxExxxxF (SEQ ID NO:59). Theo một số phương án, polypeptit Fc được cải biến bao gồm YxTEWSS (SEQ ID NO:58) và mô típ TxxExxxxF (SEQ ID NO:59).

Theo một số phương án, polypeptit Fc được cải biến bao gồm gốc axit amin kiểu hoang ở các vị trí 380, 389, 390, và 415, theo cách đánh số Châu Âu, trong đó gốc axit amin kiểu hoang này được tìm thấy ở một vị trí tương ứng ở SEQ ID NO:38.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm polypeptit Fc có các axit amin sau đây: Trp, Leu, hoặc Glu ở vị trí 380; Tyr hoặc Phe ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí 388; Ser, Ala, hoặc Val ở vị trí 389; Ser hoặc Asn ở vị trí 390; Thr hoặc Ser ở vị trí 413; Glu hoặc Ser ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm polypeptit Fc có các axit amin sau đây: Trp ở vị trí 380; Tyr ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí 388; Ser ở vị trí 389; Ser ở vị trí 390; Thr ở vị trí 413; Glu ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm polypeptit Fc có các axit amin sau đây: Glu ở vị trí 380; Phe ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí 388; Ser ở vị trí 389; Asn ở vị trí 390; Ser ở vị trí 413; Glu ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm polypeptit Fc có các axit amin sau đây: Glu ở vị trí 380; Tyr ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí 388; Val ở vị trí 389; Asn ở vị trí 390; Thr ở vị trí 413; Glu ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 bao gồm polypeptit Fc có các axit amin sau đây: Glu ở vị trí 380; Tyr ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí

388; Ser ở vị trí 389; Asn ở vị trí 390; Ser ở vị trí 413; Glu ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án, polypeptit Fc được cải biến bao gồm trình tự có độ đồng nhất ít nhất 90% với trình tự axit amin được nêu ra ở bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:40, 43, 46, và 49. Theo một số phương án, polypeptit Fc được cải biến bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở bất kỳ một trong số các SEQ ID NO:41, 44, 47, và 50.

Các ví dụ phụ thêm về polypeptit Fc được cải biến được mô tả trong Bảng 8.

Các đột biến để thúc đẩy hiện tượng heterodime hóa polypeptit Fc

Theo một số phương án, polypeptit Fc có mặt trong kháng thể kháng TREM2 như được bộc lộ trong bản mô tả này bao gồm các đột biến chốt và lỗ để thúc đẩy quá trình tạo thành heterodime và ngăn cản quá trình tạo thành homodime. Nhìn chung, dạng cải biến đưa vào chỗ lồi lên ("chốt") ở mặt phân giới của polypeptit thứ nhất và khoang tương ứng ("lỗ") trong mặt phân giới của polypeptit thứ hai, sao cho chỗ lồi lên có thể được đặt vào khoang để thúc đẩy quá trình tạo thành heterodime và vì vậy, ngăn cản quá trình tạo thành homodime. Chỗ lồi lên được kiến tạo bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin nhỏ từ mặt phân giới của polypeptit thứ nhất bằng chuỗi bên lớn hơn (*ví dụ,* tyrosin hoặc tryptophan). Các khoang có tính bù trừ có kích cỡ đồng nhất hoặc tương tự với chỗ lồi lên được tạo ra trong mặt phân giới của polypeptit thứ hai bằng cách thay thế chuỗi bên axit amin lớn bằng chuỗi bên nhỏ hơn (*ví dụ,* alanin hoặc threonin). Theo một số phương án, các đột biến phụ thêm như vậy là ở một vị trí nào đó trong polypeptit Fc mà không có tác dụng tiêu cực (*ví dụ,* có tính ức chế) đối với khả năng liên kết của polypeptit Fc vào thụ thể BBB, *ví dụ,* TfR.

Theo một phương án có tính minh họa về phương pháp dime hóa chốt và lỗ, vị trí 366 (được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu) của một trong các polypeptit Fc có mặt trong các protein được mô tả trong bản mô tả này bao gồm tryptophan thay cho threonin nguyên thể. Polypeptit Fc kia trong dime này có valin ở vị trí 407 (được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu) thay cho tyrosin nguyên thể. Polypeptit Fc kia có thể còn bao gồm dạng thay thế mà trong đó threonin nguyên thể ở vị trí 366 (được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu) được thế bằng serin và leuxin nguyên thể ở vị trí 368 (được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu) được thế bằng alanin. Vì vậy, một trong các polypeptit Fc của kháng thể kháng protein TREM2 theo sáng chế có đột biến chốt T366W và polypeptit Fc kia có đột biến Y407V, đột biết này thường đi kèm với các đột biến lỗ T366S và L368A.

Theo một số phương án, một hoặc cả hai polypeptit Fc cũng có thể được thao tác để chứa các dạng cải biến khác dùng cho hiện tượng heterodime hóa, *ví dụ,* thao tác tĩnh điện các gốc tiếp xúc trong mặt phân giới CH3-CH3 mà được tích điện một cách tự nhiên hoặc dạng cải biến miếng kỵ nước.

Theo một số phương án, có thể đưa vào dạng cải biến để tăng cường thời gian bán hủy huyết thanh. Ví dụ, theo một số phương án, một hoặc cả hai polypeptit Fc có mặt trong kháng thể kháng protein TREM2 theo sáng chế có thể bao gồm tyrosin ở vị trí 252, threonin ở vị trí 254, và axit glutamic ở vị trí 256, như được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu. Vì vậy, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể có các dạng thay thế M252Y, S254T, và T256E. Theo cách khác, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể có các dạng thay thế M428L và/hoặc N434S, theo cách đánh số Châu Âu. Theo cách khác, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể có dạng thay thế N434S hoặc N434A.

Chức năng tác động Fc

Theo một số phương án, một hoặc cả hai polypeptit Fc trong kháng thể kháng protein TREM2 được bộc lộ trong bản mô tả này có thể bao gồm dạng cải biến mà làm giảm chức năng tác động, *tức là,* có khả năng kích thích các chức năng sinh học nhất định giảm sau khi liên kết vào thụ thể Fc được biểu hiện trên tế bào tác động mà làm trung gian cho chức năng tác động. Các ví dụ về chức năng tác động kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, khả năng liên kết C1q và tính gây độc tế bào phụ thuộc vào bổ thể (complement dependent cytotoxicity-CDC), khả năng liên kết thụ thể Fc, tính gây độc tế bào do tế bào làm trung gian phụ thuộc vào kháng thể (antibody dependent cell mediated cytotoxicity-ADCC), quá trình thực bào do tế bào làm trung gian phụ thuộc vào kháng thể (antibody dependent cell mediated phagocytosis-ADCP), điều hòa giảm các thụ thể bề mặt tế bào (*ví dụ,* thụ thể tế bào B), và hoạt hóa tế bào B. Chức năng tác động có thể thay đổi với nhóm kháng thể. Ví dụ, các kháng thể IgG1 và IgG3 nguyên thể của người có thể khơi dậy các hoạt tính ADCC và CDC sau khi liên kết vào thụ thể Fc thích hợp có mặt trên tế bào hệ miễn dịch; và IgG1, IgG2, IgG3, và IgG4 nguyên thể của người có thể khơi dậy chức năng ADCP sau khi liên kết vào thụ thể Fc thích hợp có mặt trên tế bào miễn dịch.

Theo một số phương án, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể bao gồm dạng cải biến mà điều biến chức năng tác động.

Theo một số phương án, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể bao gồm dạng cải biến mà làm giảm hoặc loại bỏ chức năng tác động. Đột biến polypeptit Fc có tính minh họa mà làm giảm chức năng tác động bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, dạng thay thế trong miền CH2, *ví dụ,* ở các vị trí 234 và 235, theo giản đồ đánh số Châu Âu. Ví dụ, theo một số phương án, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể bao gồm gốc alanin ở các vị trí 234 và 235. Vì vậy, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể có dạng thay thế L234A và L235A (LALA).

Các đột biến polypeptit Fc phụ thêm mà điều biến chức năng tác động bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các đột biến sau đây: vị trí 329 có thể có đột biến mà trong đó prolin được thế bằng glyxin, arginin, serin, hoặc gốc axit amin đủ lớn để phá hủy mặt phân giới thụ thể Fc/Fcγ mà được tạo ra giữa prolin 329 của Fc và các gốc tryptophan Trp 87 và Trp 110 của FcγRIII. Các dạng thay thế có tính minh họa phụ thêm bao gồm S228P, E233P, L235E, N297A, N297D, N297G, và P331S, theo giản đồ đánh số Châu Âu. Nhiều dạng thay thế cũng có thể có mặt, *ví dụ,* L234A và L235A của vùng Fc của IgG1 của người; L234A, L235A, và P329G của vùng Fc của IgG1 của người; L234A, L235A, và P329S của vùng Fc của IgG1 của người; S228P và L235E của vùng Fc của IgG4 của người; L234A và G237A của vùng Fc của IgG1 của người; L234A, L235A, và G237A của vùng Fc của IgG1 của người; V234A và G237A của vùng Fc của IgG2 của người; L235A, G237A, và E318A của vùng Fc của IgG4 của người; và S228P và L236E của vùng Fc của IgG4 của người, theo giản đồ đánh số Châu Âu. Theo một số phương án, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể có một hoặc nhiều dạng thay thế axit amin mà điều biến ADCC, *ví dụ,* dạng thay thế ở các vị trí 298, 333, và/hoặc 334, theo giản đồ đánh số Châu Âu.

Vị trí liên kết FcRn và các đột biến để làm tăng thời gian bán hủy huyết thanh

Theo các khía cạnh nhất định, polypeptit Fc (*ví dụ,* polypeptit Fc được cải biến) có mặt trong kháng thể kháng protein TREM2 theo sáng chế, có thể bao gồm vị trí liên kết FcRn. Theo một số phương án, vị trí liên kết FcRn là trong polypeptit Fc hoặc mảnh của nó.

Theo một số phương án, vị trí liên kết FcRn bao gồm vị trí liên kết FcRn nguyên thể. Theo một số phương án, vị trí liên kết FcRn không bao gồm các thay đổi axit amin so với trình tự axit amin của vị trí liên kết FcRn nguyên thể. Theo một số phương án, vị trí liên kết FcRn nguyên thể này là vị trí liên kết IgG, *ví dụ,* vị trí liên kết IgG của người. Theo một số phương án, vị trí liên kết FcRn bao gồm dạng cải biến mà thay đổi khả năng liên kết FcRn.

Theo một số phương án, vị trí liên kết FcRn có một hoặc nhiều gốc axit amin mà được gây đột biến, *ví dụ,* được thế, trong đó (các) đột biến này làm tăng thời gian bán hủy huyết thanh hoặc về cơ bản không làm giảm thời gian bán hủy huyết thanh (*tức là,* làm giảm thời gian bán hủy huyết thanh là không lớn hơn 25% so với polypeptit Fc loại tương đương có các gốc kiểu hoang ở các vị trí được gây đột biến khi được thử nghiệm trong cùng điều kiện). Theo một số phương án, vị trí liên kết FcRn có một hoặc nhiều gốc axit amin mà được thế ở các vị trí 251-256, 428, và 433-436, theo giản đồ đánh số Châu Âu.

Theo một số phương án, một hoặc nhiều gốc tại hoặc gần vị trí liên kết FcRn được gây đột biến, so với trình tự IgG nguyên thể của người, để kéo dài thời gian bán hủy huyết thanh của polypeptit. Theo một số phương án, các đột biến được đưa vào một, hai, hoặc ba vị trí trong số các vị trí 252, 254, và 256. Theo một số phương án, các đột biến này là M252Y, S254T, và T256E. Theo một số phương án, polypeptit Fc còn bao gồm các đột biến M252Y, S254T, và T256E. Theo các phương án cụ thể, một hoặc cả hai polypeptit Fc có mặt trong kháng thể kháng protein TREM2 theo sáng chế có thể bao gồm tyrosin ở vị trí 252, threonin ở vị trí 254, và axit glutamic ở vị trí 256, như được đánh số theo giản đồ đánh số Châu Âu. Vì vậy, một hoặc cả hai polypeptit Fc có thể có các dạng thay thế M252Y, S254T, và T256E.

Theo một số phương án, các đột biến này là M428L và/hoặc N434S. Theo một số phương án, polypeptit Fc còn bao gồm đột biến N434S có hoặc không có M428L. Theo một số phương án, polypeptit Fc bao gồm đột biến tại một, hai, hoặc tất cả ba vị trí trong số các vị trí T307, E380, và N434, theo giản đồ đánh số Châu Âu. Theo một số phương án, các đột biến này là T307Q và N434A. Theo một số phương án, polypeptit Fc bao gồm các đột biến T307A, E380A, và N434A. Theo một số phương án, polypeptit Fc bao gồm các đột biến ở các vị trí T250 và M428, theo giản đồ đánh số Châu Âu. Theo một số phương án, polypeptit Fc bao gồm các đột biến T250Q và/hoặc M428L. Theo một số phương án, polypeptit Fc bao gồm các đột biến ở các vị trí M428 và N434, theo giản đồ đánh số Châu Âu. Theo một số phương án, polypeptit Fc bao gồm các đột biến M428L và N434S. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế này có thể bao gồm hai polypeptit Fc, trong đó mỗi polypeptit Fc trong số hai polypeptit Fc này bao gồm các dạng thay thế M428L và/hoặc N434S. Theo một số phương án, polypeptit Fc bao gồm đột biến N434S hoặc N434A. Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế này có thể bao gồm hai polypeptit Fc, trong đó mỗi polypeptit Fc trong số hai polypeptit Fc này bao gồm dạng thay thế N434S hoặc N434A.

V. ĐIỀU CHẾ KHÁNG THỂ

Theo một số phương án, các kháng thể được điều chế bằng cách gây miễn dịch cho động vật hoặc các động vật (*ví dụ,* chuột nhắt, thỏ hoặc chuột cống) với kháng nguyên hoặc hỗn hợp các kháng nguyên để tạo ra phản ứng kháng thể. Theo một số phương án, kháng nguyên hoặc hỗn hợp các kháng nguyên được sử dụng cùng với tá dược (*ví dụ,* tá dược của Freund). Sau khi gây miễn dịch lần đầu, một hoặc nhiều lần tiêm tăng cường tiếp theo bằng kháng nguyên hoặc các kháng nguyên này tiếp theo có thể được tiến hành để cải thiện việc sản xuất kháng thể. Sau khi được gây miễn dịch, các tế bào B đặc hiệu với kháng nguyên được thu hoạch, *ví dụ,* từ lá lách và/hoặc mô bạch huyết. Để tạo ra các kháng thể đơn dòng, các tế bào B được cho dung hợp với các tế bào u tủy, sau đó được sàng lọc để xác định tính đặc hiệu kháng nguyên. Các phương pháp điều chế kháng thể cũng được mô tả trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây.

Các gen mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đang được quan tâm có thể được tách dòng từ tế bào, *ví dụ,* các gen mã hóa kháng thể đơn dòng có thể được tách dòng từ tế bào lai và được sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng tái tổ hợp. Các thư viện gen mã hóa các chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể đơn dòng cũng có thể được tạo ra từ các tế bào lai hoặc tế bào huyết tương. Cách khác, công nghệ thể hiện trên thể thực khuẩn hoặc nấm men có thể được sử dụng để xác định các kháng thể và các mảnh Fab mà liên kết đặc hiệu với các kháng nguyên đã chọn. Các kháng thể cũng có thể được tạo ra là kháng thể đặc hiệu kép, tức là có thể nhận biết hai kháng nguyên khác nhau. Các kháng thể cũng có thể là kháng thể liên hợp khác loài, *ví dụ,* hai kháng thể liên kết cộng hóa trị hoặc độc tố miễn dịch.

Các kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng hệ thống bất kỳ trong số các hệ thống biểu hiện, bao gồm hệ thống biểu hiện sinh vật nhân sơ và sinh vật nhân chuẩn. Theo một số phương án, hệ thống biểu hiện này là biểu hiện trên tế bào động vật có vú, như tế bào lai, hoặc hệ thống biểu hiện trên tế bào CHO. Nhiều hệ thống như vậy có sẵn rộng rãi từ các nhà cung cấp thương mại. Theo các phương án, trong đó kháng thể bao gồm cả vùng V_H và V_L, các vùng V_H và V_L có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng một vectơ duy nhất, *ví dụ,* trong đơn vị biểu hiện hai xistron, hoặc dưới sự kiểm soát của các trình tự khởi đầu khác nhau. Theo các phương án khác, vùng V_H và V_L này có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng các vectơ riêng biệt. Vùng V_H và V_L như được mô tả trong bản mô tả này có thể tùy ý bao gồm metionin tại đầu tận cùng N.

Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể thể khảm. Các phương pháp tạo ra các kháng thể thể khảm đã được biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, các kháng thể thể khảm có thể được tạo ra trong đó vùng liên kết kháng nguyên (vùng biến đổi chuỗi nặng và vùng biến chuỗi nhẹ) từ một loài, như chuột nhắt, được cho dung hợp với vùng tác động (miền hằng định) của loài khác, như con người. Ví dụ khác là có thể tạo ra các kháng thể thể khảm "được chuyển nhóm" trong đó vùng tác động của kháng thể được thay thế bằng vùng tác động của nhóm hoặc phân nhóm globulin miễn dịch khác.

Theo một số phương án, kháng thể này là kháng thể được làm tương thích với người. Nhìn chung, kháng thể không phải của người được làm tương thích với người để giảm tính sinh miễn dịch của nó. Các kháng thể được làm tương thích với người thường bao gồm một hoặc nhiều vùng biến đổi (*ví dụ,* các CDR) hoặc các phần của chúng không phải là của người (*ví dụ,* được lấy từ trình tự vùng biến đổi của chuột nhắt) và có thể là, một số vùng khung hoặc các phần của chúng không phải của người, và còn bao gồm một hoặc nhiều vùng hằng định được lấy từ trình tự kháng thể người. Các phương pháp làm tương thích với người các kháng thể không phải của người đã được biết trong lĩnh vực này. Chuột nhắt chuyển gen, hoặc các sinh vật khác như động vật có vú khác, có thể được sử dụng để biểu hiện các kháng thể người hoặc được làm tương thích với người. Các phương pháp để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người bao gồm, *ví dụ,* tái tạo bề mặt miền biến đổi, ghép CDR, ghép các gốc xác định tính đặc hiệu (SDR), lựa chọn có hướng dẫn và xáo trộn khung.

Để thay thế cho kỹ thuật làm tương thích với người, các kháng thể hoàn toàn của người có thể được tạo ra. Ví dụ không giới hạn là động vật chuyển gen (*ví dụ,* chuột nhắt) có thể được tạo ra để có khả năng, khi được gây miễn dịch, tạo ra một lượng đầy đủ các kháng thể người mà không sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Ví dụ, dạng xóa bỏ đồng hợp tử của gen vùng nối chuỗi nặng của kháng thể (JH) ở chuột nhắt có đột biến dòng mầm và thể khảm được mô tả rằng dẫn đến ức chế hoàn toàn việc sản xuất kháng thể nội sinh. Việc chuyển mảng gen globulin miễn dịch của dòng mầm người vào chuột nhắt có đột biến dòng mầm như vậy sẽ dẫn đến việc sản xuất các kháng thể người khi thử thách kháng nguyên. Một ví dụ khác, các kháng thể người có thể được tạo ra bằng các phương pháp dựa trên tế bào lai, như bằng cách sử dụng các tế bào B sơ cấp của người để tạo ra các dòng tế bào tạo ra các kháng thể đơn dòng của người.

Các kháng thể người cũng có thể được sản xuất bằng công nghệ thể hiện trên thể thực khuẩn hoặc thể hiện trên nấm men. Trong quá trình thể hiện trên thể thực khuẩn, các nguồn gen chuỗi nặng biến đổi và chuỗi nhẹ biến đổi được khuếch đại và được biểu hiện trong các vectơ thể hiện trên thể thực khuẩn. Theo một số phương án, thư viện kháng thể là kho lưu trữ tự nhiên được khuếch đại từ nguồn của người. Theo một số phương án, thư viện kháng thể là thư viện tổng hợp được tạo ra bằng cách tách dòng các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và tái tổ hợp để tạo ra một phần gộp lớn các kháng thể với tính đặc hiệu kháng nguyên khác nhau. Thể thực khuẩn thường biểu hiện các mảnh kháng thể (*ví dụ,* mảnh Fab hoặc mảnh scFv), sau đó chúng được sàng lọc về khả năng liên kết với kháng nguyên đang được quan tâm.

Theo một số phương án, các mảnh kháng thể (như Fab, Fab', $F(ab')_2$, scFv, V_H, hoặc V_{HH}) được tạo ra. Nhiều kỹ thuật khác nhau đã được phát triển để sản xuất các mảnh kháng thể. Theo truyền thống, những mảnh này được tạo ra thông qua quá trình tiêu hóa phân giải protein của các kháng thể nguyên vẹn. Tuy nhiên, những mảnh này hiện có thể được sản xuất trực tiếp bằng cách sử dụng các tế bào chủ tái tổ hợp. Ví dụ, các mảnh kháng thể có thể được phân lập từ các thư viện thể thực khuẩn kháng thể. Ngoài ra, các mảnh Fab'-SH có thể được thu hồi trực tiếp từ các tế bào của *E. coli* và được liên hợp hóa học để tạo thành các mảnh $F(ab')_2$. Theo một phương pháp tiếp cận khác, các mảnh $F(ab')_2$ có thể được phân lập trực tiếp từ dịch nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Các kỹ thuật khác để sản xuất các mảnh kháng thể sẽ trở nên rõ ràng đối với những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, kháng thể hoặc mảnh kháng thể được liên hợp với một phân tử khác, *ví dụ,* polyetylen glycol (PEG hóa) hoặc albumin huyết thanh, để có được thời gian bán hủy *in vivo* kéo dài.

VI. CÁC AXIT NUCLEIC, CÁC VECTƠ, VÀ CÁC TẾ BÀO CHỦ

Theo một số phương án, các kháng thể kháng TREM2 như được bộc lộ trong bản mô tả này được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp tái tổ hợp. Do đó, theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất axit nucleic đã được phân lập bao gồm trình tự axit nucleic mã hóa các kháng thể kháng TREM2 bất kỳ như được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* một hoặc nhiều vùng trong số các CDR, các vùng biến đổi chuỗi nặng, và các vùng biến đổi chuỗi nhẹ được mô tả trong bản mô tả này); các vectơ bao gồm các axit nucleic như vậy; và các

tế bào chủ mà các axit nucleic được đưa vào, được sử dụng để sao chép các axit nucleic mã hóa kháng thể và/hoặc để biểu hiện các kháng thể.

Theo một số phương án, polynucleotit (*ví dụ,* polynucleotit đã được phân lập) bao gồm trình tự nucleotit mã hóa kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* như được mô tả trong phần trên có tiêu đề "Các Trình tự Kháng thể kháng TREM2"). Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa một hoặc nhiều trình tự axit amin (*ví dụ,* trình tự CDR, chuỗi nặng, hoặc chuỗi nhẹ) được bộc lộ trong Bảng 8 dưới đây. Theo một số phương án, polynucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hóa axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 85% (*ví dụ,* ít nhất 85%, ít nhất 90%, ít nhất 91%, ít nhất 92%, ít nhất 93%, ít nhất 94%, ít nhất 95%, ít nhất 96%, ít nhất 97%, ít nhất 98%, hoặc ít nhất 99%) với trình tự (*ví dụ,* trình tự CDR, chuỗi nặng, hoặc chuỗi nhẹ) được bộc lộ trong Bảng 8 dưới đây. Theo một số phương án, polynucleotit như được mô tả trong bản mô tả này được liên kết chức năng với axit nucleic khác loài, *ví dụ,* trình tự khởi đầu khác loài.

Các vectơ thích hợp chứa polynucleotit mã hóa các kháng thể theo sáng chế, hoặc các mảnh của chúng, bao gồm vectơ tách dòng và vectơ biểu hiện. Mặc dù vectơ tách dòng được chọn có thể thay đổi tùy theo tế bào chủ dự định sẽ được sử dụng, vectơ tách dòng hữu ích thường có khả năng tự sao chép, có thể có một đích duy nhất cho endonucleaza giới hạn cụ thể và/hoặc có thể mang gen cho chỉ thị mà có thể được sử dụng để chọn các dòng chứa vectơ này. Ví dụ bao gồm plasmit và virut vi khuẩn, *ví dụ,* pUC18, pUC19, Bluescript (*ví dụ,* pBS SK+) và các dẫn xuất của nó, mpl8, mpl9, pBR322, pMB9, ColE1, pCR1, RP4, các ADN thể thực khuẩn và vectơ con thoi như pSA3 và pAT28. Những vectơ tách dòng này và nhiều vectơ tách dòng khác có sẵn trên thị trường bởi các nhà cung cấp thương mại như BioRad, Strategene và Invitrogen.

Các vectơ biểu hiện nhìn chung là cấu trúc polynucleotit có thể sao chép chứa axit nucleic theo sáng chế. Vectơ biểu hiện có thể sao chép trong tế bào chủ dưới dạng các episom hoặc như một phần không thể tách rời của ADN nhiễm sắc thể. Các vectơ biểu hiện thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, vectơ virut, bao gồm adenovirut, virut gắn liền với adenovirut, retrovirut và vectơ bất kỳ khác.

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện polynucleotit hoặc vectơ như được mô tả trong bản mô tả này bao gồm các tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn. Theo một số phương án, tế bảo chủ là tế bào nhân sơ. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào

nhân chuẩn, *ví dụ,* tế bào Buồng trứng Chuột đồng Trung Quốc (CHO) hoặc tế bào bạch huyết. Theo một số phương án, tế bào chủ là tế bào người, *ví dụ,* tế bào Thận Phôi Người (HEK).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp tạo ra kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, các phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ như được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* tế bào chủ biểu hiện polynucleotit hoặc vectơ như được mô tả trong bản mô tả này) dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể. Theo một số phương án, kháng thể sau đó được thu hồi từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

VII. CÁC PHƯƠNG PHÁP TRỊ LIỆU SỬ DỤNG CÁC KHÁNG THỂ KHÁNG TREM2

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các phương pháp trị liệu sử dụng kháng thể kháng TREM2 như được bộc lộ trong bản mô tả này (*ví dụ,* kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong Phần III ở trên). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp điều biến một hoặc nhiều hoạt tính TREM2 (*ví dụ,* ở đối tượng bị bệnh thoái hóa thần kinh).

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp điều trị bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một số phương án, bệnh thoái hóa thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer, bệnh do protein tau liên quan đến tuổi tác nguyên phát, bệnh liệt trên nhân tiến triển (progressive supranuclear palsy-PSP), sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán thái dương, sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán thái dương kèm hội chứng Parkinson liên quan đến nhiễm sắc thể 17, bệnh sa sút trí tuệ có hạt ưa bạc, bệnh xơ cứng teo cơ một bên, phức hệ bệnh xơ cứng teo cơ một bên/hội chứng Parkinson-bệnh sa sút trí tuệ của Guam (amyotrophic lateral sclerosis/parkinsonism-dementia complex of Guam-ALS PDC), thoái hóa hạch đáy-vỏ não, bệnh não mãn tính do chấn thương, bệnh Creutzfeldt-Jakob, sa sút trí tuệ do chấn thương não, bệnh vôi hóa đám rối sợi thần kinh phân tán, hội chứng Down, bệnh sa sút trí tuệ có tính cách gia đình kiểu Anh, bệnh sa sút trí tuệ có tính cách gia đình kiểu Đan Mạch, bệnh Gerstmann-Straussler-Scheinker, bệnh do protein tau thần kinh đệm hình cầu, hội chứng Parkinson Goa-đê-lốp kèm sa sút trí tuệ, PSP Goa-đê-lốp, bệnh Hallevorden-Spatz, bệnh não chất trắng lan tỏa di truyền có hình phỏng cầu (hereditary

diffuse leukoencephalopathy with spheroid-HDLS), bệnh Huntington, viêm cơ thể vùi, bệnh teo đa hệ thống, bệnh loạn dưỡng trương lực cơ, bệnh Nasu-Hakola, sa sút trí tuệ chủ yếu do đám rối sợi thần kinh, bệnh Niemann-Pick loại C, thoái hóa tế bào thần kinh nhạt-mái cầu-chất đen, bệnh Parkinson, bệnh Pick, hội chứng Parkinson sau viêm não, bệnh mạch máu não do dạng tinh bột và protein prion, tăng sinh thần kinh đệm dưới vỏ não tiến triển, viêm não toàn bộ xơ hóa bán cấp, và sa sút trí tuệ chỉ do đám rối. Theo một số phương án, bệnh thoái hóa thần kinh là bệnh Alzheimer. Theo một số phương án, bệnh thoái hóa thần kinh là bệnh Nasu-Hakola. Theo một số phương án, bệnh thoái hóa thần kinh là sa sút trí tuệ do thoái hóa thùy trán thái dương. Theo một số phương án, bệnh thoái hóa thần kinh là bệnh Parkinson. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng kháng thể được phân lập hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với protein TREM2 người, *ví dụ,* kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc Dược phẩm chứa kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 (hoặc phần liên kết kháng nguyên hoặc dược phẩm chứa nó) như được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị bệnh thoái hóa thần kinh mà được xác định đặc điểm bởi đột biến ở TREM2. Theo một số phương án, bệnh thoái hóa thần kinh mà được xác định đặc điểm bởi đột biến ở TREM2 là bệnh Alzheimer, *ví dụ,* bệnh Alzheimer mà được xác định đặc điểm bởi đột biến R47H ở TREM2.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp điều biến một hoặc nhiều hoạt tính TREM2 ở đối tượng (*ví dụ,* đối tượng bị bệnh thoái hóa thần kinh). Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc điều biến các mức sTREM2; điều biến khả năng thu nạp hoặc phosphoryl hóa kinaza mà tương tác với phức hợp truyền tín hiệu TREM2/DAP12 (*ví dụ,* kinaza Syk); điều biến khả năng thực bào (*ví dụ,* sự thực bào các mảnh vỡ tế bào, các hạt dạng tinh bột beta, v.v.); điều biến khả năng di chuyển của tế bào (*ví dụ,* khả năng di chuyển của các tế bào tủy, các đại thực bào, vi tế bào thần kinh đệm, và vi tế bào thần kinh đệm gắn liền với bệnh); và/hoặc điều biến khả năng biệt hóa của tế bào (*ví dụ,* đối với các tế bào tủy, các đại thực bào, vi tế bào thần kinh đệm, và vi tế bào thần kinh đệm gắn liền với bệnh). Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp tăng cường một hoặc nhiều hoạt tính TREM2 ở đối tượng bị bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp làm giảm mức sTREM2 ở đối

tượng bị bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một số phương án, phương pháp điều biến một hoặc nhiều hoạt tính TREM2 ở đối tượng bao gồm việc cho đối tượng này sử dụng kháng thể được phân lập hoặc phần liên kết kháng nguyên của nó liên kết đặc hiệu với protein TREM2 người, *ví dụ,* kháng thể kháng TREM2 như mô tả trong bản mô tả này, hoặc dược phẩm chứa kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, đối tượng được điều trị là người, *ví dụ,* người trưởng thành hoặc trẻ em.

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các phương pháp làm giảm mức tích tụ mảng ở đối tượng bị bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng sử dụng kháng thể hoặc dược phẩm như được mô tả trong bản mô tả này. Theo một số phương án, đối tượng này mắc bệnh Alzheimer. Theo một số phương án, đối tượng này là mô hình động vật bị bệnh thoái hóa thần kinh (*ví dụ,* mô hình chuột 5XFAD hoặc APP/PS1). Theo một số phương án, mức tích tụ mảng được đo bằng kỹ thuật chụp ảnh mảng tinh bột và/hoặc chụp ảnh Tau, *ví dụ,* sử dụng kỹ thuật quét chụp cắt lớp phát xạ positron (PET). Theo một số phương án, việc sử dụng kháng thể kháng TREM2 làm giảm mức tích tụ mảng ít nhất 20%, ít nhất 30%, ít nhất 40%, ít nhất 50%, ít nhất 60%, ít nhất 70%, ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90% so với trị số đường cơ sở (*ví dụ,* mức tích tụ mảng ở đối tượng trước khi cho sử dụng kháng thể kháng TREM2).

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 được sử dụng cho đối tượng ở mức liều lượng hoặc lượng hữu hiệu về mặt trị liệu. Tuy nhiên, các liều lượng có thể được thay đổi theo một vài yếu tố, bao gồm đường dùng được chọn, dạng chế phẩm của chế phẩm, đáp ứng của bệnh nhân, mức độ trầm trọng của tình trạng, trọng lượng của đối tượng, và phán đoán của bác sĩ kê đơn. Có thể làm tăng hoặc giảm liều lượng theo thời gian, khi cần thiết theo bệnh nhân riêng biệt. Trong trường hợp nhất định, vào lúc ban đầu, bệnh nhân được cho dùng liều lượng thấp, sau đó liều này được tăng lên đến liều lượng hiệu nghiệm mà bệnh nhân có thể dung nạp được. Việc xác định liều lượng hiệu nghiệm nằm trong khả năng của những người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này.

Đường dùng của kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này có thể là cấp qua miệng, trong màng bụng, qua da, dưới da, trong tĩnh mạch, trong cơ, trong nước của cột thần kinh, xông hít, khu trú bên ngoài, trong thương tổn, trực tràng, trong phế quản, mũi, niêm mạc, ruột, trong tai hoặc trong mắt, hoặc phương pháp bất kỳ khác được biết

đến trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, kháng thể này được dùng theo đường miệng, trong tĩnh mạch, hoặc trong màng bụng.

Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 (và tùy ý là một chất trị liệu khác) được sử dụng cho đối tượng trong một thời gian dài, *ví dụ,* ít nhất 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 150, 200, 250, 300, 350 ngày hoặc lâu hơn.

VIII. CÁC DƯỢC PHẨM VÀ KIT

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các dược phẩm và kit bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với protein TREM2 người. Theo một số phương án, các dược phẩm và kit là để sử dụng để điều trị bệnh thoái hóa thần kinh. Theo một số phương án, các dược phẩm và kit là để sử dụng để điều biến (*ví dụ,* tăng cường hoặc ức chế) một hoặc nhiều hoạt tính TREM2, *ví dụ,* quá trình phosphoryl hóa Syk. Theo một số phương án, các dược phẩm và kit là để sử dụng để điều biến (*ví dụ,* làm giảm) các mức sTREM2.

Dược phẩm

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các dược phẩm chứa kháng thể kháng TREM2 hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 là kháng thể như được mô tả trong Phần III ở trên hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, dược phẩm chứa kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này và bao gồm thêm một hoặc nhiều chất mang và/hoặc tá dược được dụng. Chất mang dược dụng bao gồm dung môi, môi trường phân tán, hoặc chất bao phủ bất kỳ mà tương hợp về mặt sinh lý học và không cản trở hoặc cách khác là ức chế hoạt tính của chất có hoạt tính. Các tá dược dược dụng khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một số phương án, chất mang là thích hợp cho phương thức dùng trong tĩnh mạch, trong cơ, qua đường miệng, trong màng bụng, trong nước của cột thần kinh, qua da, khu trú bên ngoài, hoặc dưới da. Chất mang dược dụng có thể chứa một hoặc nhiều hợp chất có thể chấp nhận được về mặt sinh lý mà hoạt động, ví dụ, để làm ổn định chế phẩm hoặc để làm tăng hoặc làm giảm mức hấp thụ của (các) chất có hoạt tính. Hợp chất có thể chấp nhận được về mặt sinh lý có thể bao gồm, ví dụ, carbohydrat, như glucoza, sucroza, hoặc dextran, chất chống oxy hóa, như axit ascorbic hoặc glutathion, chất tạo chelat, protein trọng lượng phân tử thấp, chế phẩm mà làm giảm mức thanh thải hoặc thủy phân của chất

có hoạt tính, hoặc tá dược hoặc chất làm ổn định khác và/hoặc dung dịch đệm. Các chất mang dược dụng khác và các dạng chế phẩm của chúng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Dược phẩm được mô tả trong bản mô tả này có thể được sản xuất theo cách thức được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này biết rõ, *ví dụ,* bằng phương tiện là các quy trình trộn, hòa tan, tạo hạt, tạo viên bao đường, nhũ hóa, đóng nang, kìm giữ hoặc làm đông khô thông thường. Các phương pháp và tá dược sau đây chỉ để làm ví dụ và không giới hạn sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Đối với phương thức cho dùng qua đường miệng, kháng thể kháng TREM2 có thể được tạo dạng chế phẩm bằng cách kết hợp chất này với chất mang dược dụng mà đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các chất mang như vậy giúp tạo dạng chế phẩm được các hợp chất ở dạng viên nén, viên tròn, viên bao đường, viên nang, nhũ tương, huyền phù ưa chất béo và huyền phù ưa nước, chất lỏng, gel, xi rô, chất sền sệt, huyền phù và các dạng tương tự, để bệnh nhân sẽ được điều trị ăn/uống qua đường miệng. Có thể thu được các dược phẩm để sử dụng qua đường miệng bằng cách trộn các hợp chất này với tá dược rắn, tùy ý xay hỗn hợp thu được, và chế biến hỗn hợp hạt, sau khi bổ sung các chất phụ trợ thích hợp, nếu mong muốn, để thu được viên nén hoặc lõi viên bao đường. Tá dược thích hợp bao gồm, ví dụ, các chất độn đầy như đường, bao gồm cả lactoza, sucroza, manitol, hoặc sorbitol; các chế phẩm xenluloza như, ví dụ, tinh bột ngô, tinh bột lúa mì, tinh bột lúa gạo, tinh bột khoai tây, gelatin, gôm tragacan, metyl xenluloza, hydroxypropylmetyl-xenluloza, natri carboxymetylxenluloza, và/hoặc polyvinylpyrolidon (PVP). Nếu mong muốn, có thể bổ sung chất gây rã, như polyvinyl pyrolidon được liên kết ngang, agar, hoặc axit alginic hoặc muối của chúng như natri alginat.

Kháng thể kháng TREM2 có thể được tạo dạng chế phẩm cho phương thức dùng ngoài đường tiêu hóa bằng phương pháp tiêm, *ví dụ,* bằng phương pháp tiêm nhanh hoặc tiêm truyền liên tục. Đối với phương pháp tiêm, hợp chất hoặc các hợp chất này có thể được tạo dạng chế phẩm thành các chế phẩm bằng cách hòa tan, tạo huyền phù, hoặc nhũ hóa chúng trong dung môi nước hoặc dung môi không phải nước, như dầu thực vật hoặc các loại dầu tương tự khác, glyxerit axit béo tổng hợp, este của axit béo cao hơn hoặc propylen glycol; và nếu mong muốn, với các chất phụ gia thông thường như chất làm tan, chất đẳng trương, chất tạo huyền phù, chất nhũ hóa, chất làm ổn định, và chất bảo quản. Theo một số phương

án, các hợp chất này có thể được tạo dạng chế phẩm trong dung dịch nước, *ví dụ,* trong dung dịch đệm tương hợp về mặt sinh lý học, như dung dịch Hanks, dung dịch Ringer, hoặc dung dịch đệm muối sinh lý. Dạng chế phẩm dùng cho phương pháp tiêm có thể được trình bày dưới dạng liều dùng đơn vị, *ví dụ,* trong ống thuốc tiêm hoặc trong vật chứa đa liều lượng, có chất bảo quản được thêm. Chế phẩm có thể có dạng như huyền phù, dung dịch, hoặc nhũ tương trong chất dẫn dạng dầu hoặc chất dẫn dạng nước, và có thể chứa các chất dùng cho dạng chế phẩm như chất tạo huyền phù, chất làm ổn định, và/hoặc chất phân tán.

Thông thường, dược phẩm để sử dụng trong phương thức dùng *in vivo* là vô trùng. Quá trình tiệt trùng có thể được hoàn tất theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, *ví dụ,* tiệt trùng bằng nhiệt, tiệt trùng bằng hơi nước, lọc vô trùng, hoặc chiếu xạ.

Các liều dùng và nồng độ thuốc mong muốn của dược phẩm theo sáng chế có thể thay đổi tùy thuộc vào cách sử dụng cụ thể được dự liệu. Việc xác định liều lượng hoặc đường dùng thích hợp được người có trình độ trung bình trong lĩnh vực này biết rõ. Các liều dùng thích hợp thì cũng được mô tả ở Mục VII trên đây.

Kits

Theo một số phương án, sáng chế đề xuất các kit bao gồm kháng thể kháng TREM2. Theo một số phương án, kháng thể kháng TREM2 là kháng thể như được mô tả ở Mục III trên đây hoặc mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Theo một số phương án, kit này còn bao gồm một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung. Ví dụ, theo một số phương án, kit này bao gồm kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này và bao gồm thêm một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung để sử dụng trong việc điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, *ví dụ,* bệnh Alzheimer. Theo một số phương án, chất trị liệu này là chất để sử dụng trong việc điều trị triệu chứng về nhận thức hoặc hành vi của bệnh thoái hóa thần kinh (*ví dụ,* chất chống trầm cảm, chất chủ vận dopamin, hoặc thuốc chống loạn thần). Theo một số phương án, chất trị liệu là chất bảo vệ thần kinh (*ví dụ,* carbidopa/levodopa, chất kháng tác động kiểu cholin, chất tác động kiểu dopamin, chất ức chế monoamin oxidaza B (MAO-B), chất ức chế catechol-O-metyl transferaza (COMT), chất tác động kiểu glutamat, chất ức chế histon deaxetylaza (HDAC), canabinoit, chất ức chế caspaza, melatonin, chất chống viêm, hoóc-môn (ví dụ, estrogen hoặc progesteron), hoặc vitamin).

Theo một số phương án, kit này bao gồm kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này và bao gồm thêm một hoặc nhiều thuốc thử để đo các mức sTREM2. Theo một số phương án, kit này bao gồm kháng thể kháng TREM2 như được mô tả trong bản mô tả này và bao gồm thêm một hoặc nhiều thuốc thử để đo hoạt tính TREM2 (*ví dụ,* để đo mức phosphoryl hóa Syk).

Theo một số phương án, kit này còn bao gồm tài liệu chỉ dẫn chứa các hướng dẫn (*tức là,* quy trình) về việc thực hành các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này (*ví dụ,* các hướng dẫn về việc sử dụng kit cho phương pháp điều trị như được mô tả ở Mục VI trên đây). Trong khi tài liệu chỉ dẫn thường bao gồm tài liệu viết hoặc tài liệu in, thì chúng không bị giới hạn vào dạng như vậy. Phương tiện bất kỳ có khả năng lưu trữ các hướng dẫn như vậy và có khả năng truyền thông chúng đến người sử dụng cuối được dự liệu theo sáng chế này. Các phương tiện bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, phương tiện lưu trữ điện tử (*ví dụ,* đĩa từ tính, băng, hộp dễ nạp, chip), phương tiện quang học (*ví dụ,* CD-ROM), và các phương tiện tương tự. Các phương tiện như vậy có thể bao gồm địa chỉ đến trang mạng mà cung cấp tài liệu chỉ dẫn như vậy.

IX. VÍ DỤ THỰC HIỆN SÁNG CHẾ

Sáng chế sẽ được mô tả chi tiết hơn bằng các ví dụ cụ thể. Các ví dụ sau đây chỉ được cung cấp cho mục đích minh họa và không nhằm mục đích giới hạn phạm vi sáng chế theo bất kỳ cách nào.

Ví dụ 1. Tạo và xác định đặc điểm ban đầu của các kháng thể kháng TREM2

Biển hiện tái tổ hợp và tinh chế ECD TREM2 người dung hợp với Fc của chuột nhắt

Miền kéo dài sang ngoại bào (các gốc 19-172) của TREM2 người (UniProtKB ID - Q9NZC2) được tách dòng phụ vào vectơ pRK với tín hiệu tiết từ chuỗi kappa V-III của IgG của chuột nhắt, các axit amin 1-20 (UniProtKB ID - P01661) tại vùng đầu tận cùng N, và thẻ Fc của chuột nhắt tại vùng đầu tận cùng C có GGGGS (SEQ ID NO: 34) giữa ECD TREM2 và Fc.

Plasmit đã được tinh chế được chuyển nhiễm vào các tế bào Expi293F™ (Thermo Fisher) bằng cách sử dụng Kit Hệ Biểu hiện Expi293F™ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Để ức chế sự trưởng thành của các glycan liên kết N và giảm tính không đồng nhất của quá trình glycosyl hóa, kifunensine (Sigma), một chất ức chế mannosidaza I cao đã được thêm vào

môi trường nuôi cấy ở nồng độ 1 µg/mL ngay sau khi chuyển nhiễm. Các tế bào đã được chuyển nhiễm được ủ trong máy lắc tròn (Infors HT Multitron) ở tốc độ 125 vòng/phút và 37 °C trong môi trường ẩm CO_2 6%. Yếu tố tăng cường Chuyển nhiễm ExpiFectamine™ 293 1 và 2 được thêm vào các tế bào 16 giờ sau khi chuyển nhiễm và dịch nổi môi trường được thu hoạch trong 96 giờ sau khi chuyển nhiễm. Dịch nổi đã được làm trong được thêm chất ức chế proteaza không chứa EDTA (Roche) và được bảo quản ở -80 °C.

Để phân lập rTREM2 của người-Fc, dịch nổi đã được làm trong được nạp vào cột ái lực Protein A HiTrap MabSelect SuRe (GE Healthcare Life Sciences) và được rửa bằng arginin 200 mM và dung dịch đệm sucxinat 137 mM độ pH 5,0. Protein dung hợp được rửa giải trong dung dịch đệm xitrat QB 100 mM, độ pH 3,0 và NaCl 50 mM. Ngay sau khi rửa giải, dung dịch đệm Tris-HCl 1M độ pH 8,0 được thêm vào dung dịch protein để trung hòa độ pH. Các khối kết tụ protein được tách bằng phương pháp sắc ký rây phân tử (SEC) trên cột Superdex 200 Increase 10/300 GL (GE Healthcare Life Sciences). Dung dịch đệm pha động SEC được giữ ở Tris-HCl 20 mM độ pH 8,0, NaCl 100 mM và arginin 50 mM, đây cũng là dung dịch đệm lưu trữ protein. Tất cả các bước sắc ký được thực hiện trên hệ thống AKTA tinh khiết hoặc AKTA Avant (GE Healthcare Life Sciences).

Biển hiện tái tổ hợp và tinh chế ECD TREM2 được gắn thẻ His

Miền kéo dài sang ngoại bào (các gốc 19-172) của TREM2 (UniProtKB - Q9NZC2) được tách dòng phụ vào vectơ pRK với tín hiệu tiết từ chuỗi kappa V-III của Ig của chuột nhắt, các axit amin 1-20 (UniProtKB ID - P01661) tại vùng đầu tận cùng N và thẻ 6X-His (SEQ ID NO: 35) tại vùng đầu tận cùng C. Đột biến gắn xen này đã được xác minh bằng cách giải trình tự và phương pháp tinh chế plasmit bằng kit maxiprep được thực hiện.

Plasmit đã được tinh chế được chuyển nhiễm vào các tế bào Expi293F™ (Thermo Fisher) bằng cách sử dụng Kit Hệ Biểu hiện Expi293F™ theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào đã được chuyển nhiễm được ủ trong máy lắc tròn (Infors HT Multitron) ở tốc độ 125 vòng/phút và 37 °C trong môi trường ẩm CO_2 6%. Yếu tố tăng cường Chuyển nhiễm ExpiFectamine™ 293 1 và 2 được thêm vào các tế bào 16 giờ sau khi chuyển nhiễm và dịch nổi môi trường được thu hoạch trong 96 giờ sau khi chuyển nhiễm.

Môi trường thu hoạch được thêm imidazol 1M độ pH 8,0 đến nồng độ cuối cùng là 10 mM và được lọc bằng cách sử dụng các bộ lọc dùng một lần Nalgene™ Rapid-Flow™ (Thermo Fisher) với kích thước lỗ 0,4 micron. Nhựa HisPur™ Ni-NTA (Thermo Fisher) được rửa

bằng nước MQ và được làm cân bằng bằng đệm nạp (Tris 20 mM độ pH 8,0, NaCl 150 mM và imidazol 10 mM). Việc tinh chế ái lực được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp dòng chảy nhờ trọng lực. Môi trường thu hoạch được nạp vào nhựa và các protein liên kết không đặc hiệu được rửa bằng đệm nạp được thêm imidazol 50 mM và 100 mM. Miền kéo dài sang ngoại bào TREM2 được gắn thẻ His đã liên kết được rửa giải với Tris 20 mM độ pH 8,0, NaCl 150 mM và imidazol 200 mM. Protein đã rửa giải được cô bằng cách sử dụng thiết bị cô Amicon 10 kDa và protein cô đặc được tinh chế tiếp bằng sắc ký lọc gel sử dụng hệ thống AKTA Avant (GE Healthcare Life Sciences). Protein được nạp vào cột HiLoad Superdex 200 16/600 (GE Healthcare Life Sciences) được làm cân bằng PBS 1 lần và rửa giải và cất phân đoạn bằng cách sử dụng PBS 1 lần làm đệm chạy. Các phân đoạn rửa giải được phân tích bằng phương pháp điện di trên gel polyacrylamit (PAGE) trong các điều kiện làm biến tính và nguyên thể. Các phân đoạn rửa giải còn được xác định đặc điểm bằng phương pháp sắc ký rây phân tử phân tích và xác định khối lượng protein nguyên vẹn. Các kết quả từ PAGE và phương pháp xác định đặc điểm phân tích được sử dụng để gộp các phân đoạn protein bị glycosyl hóa nặng và chúng được chia phân ước và bảo quản ở -80 °C.

Tạo ra các kháng thể

Động vật gặm nhấm (chuột nhắt và chuột cống) được gây miễn dịch bằng quy trình chuẩn với chất sinh miễn dịch rhTREM2-Fc hoặc các tế bào BWZ biểu hiện thụ thể Trem2 có chiều dài đầy đủ. Các hiệu giá được đo trong suốt quá trình gây miễn dịch bằng cách sử dụng huyết thanh được thu gom tại các thời điểm khác nhau. Việc phát hiện đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với kháng nguyên được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy với chất sinh miễn dịch rhTREM2-Fc và các tế bào BWZ sống biểu hiện TREM2 có chiều dài đầy đủ. Tiêu chí lựa chọn các kháng thể ứng viên bao gồm khả năng sản xuất kháng thể của động vật gặm nhấm và tính đặc hiệu liên kết với TREM2 được phát hiện bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Các tế bào tiết kháng thể được phân lập từ các mô miễn dịch của động vật bao gồm lá lách, hạch bạch huyết và tủy xương.

Các thể hỗn dịch tế bào đơn lẻ được phân tích để xác định các đặc tính liên kết của các kháng thể được tiết ra. Các tế bào tiết kháng thể được nạp vào các thiết bị vi kênh dẫn và được phân lập trong các buồng phản ứng thể tích nanolit để cho phép phát hiện các kháng thể tiết ra bằng cách sử dụng các thử nghiệm hiển vi dựa trên hình ảnh huỳnh quang và

trường sáng (*xem, ví dụ*, Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 9,188,593). Các thử nghiệm liên kết liên quan đến việc phát hiện các kháng thể liên kết với vi hạt được phủ kháng nguyên, phát hiện liên kết kháng nguyên được đánh dấu huỳnh quang tan được với kháng thể được cố định trên hạt và phát hiện kháng thể liên kết với các kháng nguyên biểu hiện trên bề mặt tế bào được thực hiện. Các kháng nguyên biểu hiện trên bề mặt tế bào bao gồm cả dạng tái tổ hợp và dạng nguyên thể của các kháng nguyên có trên bề mặt tế bào.

Phép phân tích hình ảnh được sử dụng để xác định các buồng có tín hiệu huỳnh quang dương tính, biểu lộ sự có mặt của một tế bào đơn lẻ tạo ra các kháng thể với các đặc tính mong muốn và các lượng chứa trong các buồng được thu hồi và được phân giải trong các đĩa 384 giếng (*xem, ví dụ*, Bằng sáng chế Hoa Kỳ Số 10,087,408). Sau đó, các sản phẩm phân giải tế bào đơn lẻ được phân tích RT-PCR để khuếch đại các trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Sau đó, các sản phẩm khuếch đại thu được được giải trình tự để xác định trình tự cADN của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng được ghép cặp từ các tế bào đơn lẻ đã chọn. Các trình tự thu được được phân tích và kiểm tra thủ công để xác định tính đa dạng của trình tự và siêu đột biến soma. Các trình tự được chọn để biểu hiện dựa trên dữ liệu sàng lọc và sự đa dạng của trình tự. Các kháng thể được biểu hiện đã được thử nghiệm để xác nhận tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên.

Ví dụ 2. Tối ưu hóa trình tự và làm tương thích với người các kháng thể kháng TREM2

Kháng thể kháng TREM2 làm ví dụ được tối ưu hóa trình tự và được làm tương thích với người, sau đó là quá trình xác định đặc điểm về động học liên kết và tính đặc hiệu liên kết.

Quá trình tối ưu hóa trình tự được thực hiện bằng cách tìm kiếm trong phạm vi các trình tự CDR cho ra các gốc mà dễ bị ảnh hưởng bởi dạng cải biến hóa học (*ví dụ,* mô típ khử amit asparagin (NG), mô típ đồng phân hóa axit aspartic (DS), và các gốc oxy hóa tiềm năng (tryptophan (W) và metionin (M)) và tạo ra dạng thay thế axit amin bằng các gốc dòng mầm và có tính bảo tồn để loại bỏ các gánh nặng trách nhiệm trình tự như vậy. Sau đó, các biến thể được làm tương thích với người và được tối ưu hóa trình tự của kháng thể kháng TREM2 được phân tích về động học liên kết bằng cách sử dụng Biacore và khả năng liên kết tế bào được chuẩn độ về liều lượng vào tế bào HEK293-H6 (xem, Ví dụ 5 về các quy trình tiêu biểu).

Ví dụ 3. Tạo ra kháng thể kháng TREM2 có polypeptit Fc được cải biến ("ATV:TREM2")

Vùng Fd (V_H+CH1) của kháng thể kháng TREM2 được làm trưởng thành về ái lực, được làm tương thích với người (các SEQ ID NO:22 và 24) được tách dòng vào vectơ biểu hiện bao gồm trình tự mã hóa polypeptit Fc được thao tác để liên kết vào thụ thể transferin (TfR) của người (CH3C.35.23.1.1, CH3C.35.23.3, CH3C.35.23.3 cisLALA, hoặc CH3C.35.24) hoặc trình tự mã hóa polypeptit Fc mà liên kết vào thụ thể transferin của khỉ đuôi dài (CH3C.35.21). Trình tự mã hóa polypeptit Fc còn chứa đột biến "chốt" (T366W) để phòng ngừa hiện tượng homodime hóa và thúc đẩy hiện tượng heterodime hóa bằng polypeptit Fc bao gồm các đột biến "lỗ" (T366S/L368A/Y407V). Vùng Fd cũng được tách dòng vào vectơ "lỗ" tương ứng bao gồm trình tự mã hóa polypeptit Fc có các đột biến lỗ, nhưng thiếu các đột biến liên kết TfR. Các trình tự mã hóa (cả cấu trúc Fd-chốt-Fc và cấu trúc Fd-lỗ-Fc) còn chứa các đột biến "LALA" (L234A; L235A) trong vùng bản lề để làm giảm chức năng tác động (Wines *và đồng tác giả, J. Immunol. 164*:5313-5318 (2000) và các đột biến "LS" (M428L; N434S) trong vùng Fc CH3 để làm tăng khả năng liên kết vào FcRn (xem, *ví dụ,* Zalevsky *và đồng tác giả, Nat. Biotech. 28*(2):157-159 (2010)). Các trình tự chuỗi nặng được mã hóa cuối cùng được biểu hiện bởi vectơ được nêu ra trong Bảng 1.

Bảng 1. Các trình tự ATV:TREM2

ATV:TREM2	**Chuỗi nặng thứ nhất**	**Chuỗi nặng thứ hai**
số 1	SEQ ID NO:42	SEQ ID NO:53
số 2	SEQ ID NO:45	SEQ ID NO:53
số 3	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:53
số 4	SEQ ID NO:48	SEQ ID NO:52
số 5	SEQ ID NO:51	SEQ ID NO:53

Các vectơ chốt và lỗ được đề cập trên đây tương ứng được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào ExpiCHO hoặc Expi293 cùng với vectơ chuỗi nhẹ tương ứng (SEQ ID NO:54) theo tỷ số chốt:lỗ:chuỗi nhẹ là 1:1:2. Protein được biểu hiện này được tinh chế bằng sắc ký Protein A, sau đó là sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) điều chế để phân lập kháng thể kháng protein TREM2 được tinh chế.

Khả năng liên kết của kháng thể kháng protein TREM2 vào thụ thể transferin của người được xác định như sau: Fab kháng của người được làm bất động trên chip CM5, và kháng thể kháng protein TREM2 này được bắt. TfR có chiều dài đầy đủ của người hoặc miền đỉnh TfR của người ở mức pha loãng theo dãy nối tiếp (*ví dụ,* các nồng độ là 1-1.000 nM) được để chảy trên chip này (thời gian kết hợp 180 giây) và sau đó, được phép phân ly. Việc làm khớp được thực hiện bằng cách sử dụng mô hình liên kết 1:1.

Ví dụ 4. Xác định đặc điểm các kháng thể kháng TREM2

Các mục sau đây mô tả các thử nghiệm khác nhau được thực hiện để đánh giá các đặc điểm chức năng và liên kết của kháng thể kháng TREM2 được tạo ra.

Đo ái lực bằng phương pháp đo động học Biacore

Cộng hưởng plasmon bề mặt (công cụ Biacore™ 8K) được sử dụng để đo các ái lực của kháng thể kháng TREM2 đối với ECD TREM2 của người và khỉ đuôi dài. Kháng thể kháng TREM2 được bắt bằng cách sử dụng Human Fab Capture Kit (GE Healthcare Life Sciences, Số hiệu theo Quyển danh mục: 28958325) trên chip cảm biến Biacore Series S CM5 (GE Healthcare Life Sciences, Số hiệu theo Quyển danh mục: 29149604). Các dịch pha loãng 3 lần theo dãy nối tiếp của TREM2 tái tổ hợp của người hoặc khỉ đuôi dài được bơm ở tốc độ dòng chảy là 30 µL/phút. Khả năng liên kết kháng thể được theo dõi trong 300 giây, sau đó là, theo dõi hiện tượng phân ly kháng thể trong 600+ giây trong dung dịch đệm chạy HBS-EP+ (GE Healthcare Life Sciences, Số hiệu theo Quyển danh mục: BR100669). Đáp ứng liên kết được chỉnh sửa bằng cách lấy pin dòng chảy trống trừ đi trị số RU. Mô hình Languir 1:1 của phương pháp làm khớp đồng thời về k_{on} và k_{off} được sử dụng cho phép phân tích động học. Trị số liên kết K_D được tính toán từ k_{on} và k_{off}.

Đánh giá khả năng liên kết TREM2 ở các tế bào HEK biểu hiện TREM2

Các đặc điểm liên kết của kháng thể kháng TREM2 được đánh giá ở tế bào HEK 293 biểu hiện TREM2 của người như sau.

Dòng tế bào HEK 293 biểu hiện ổn định TREM2/DAP12 của người được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm các tế bào với vectơ lần lượt biểu hiện TREM2 và DAP12, và DAP12 riêng rẽ kiểu hoang của người. Các dòng biểu hiện ổn định đã được chọn và mức biểu hiện TREM2 trên bề mặt tế bào được đánh giá bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Kháng thể đơn dòng kháng TREM2 của người/chuột nhắt của chuột cống được liên hợp

với APC (R&D, Số hiệu theo Quyển danh mục: MAB17291) được sử dụng để phát hiện sự biểu hiện TREM2 trên bề mặt. Dòng thể hiện mức biểu hiện TREM2 kiểu hoang cao nhất được chọn và được đặt tên là "HEK293-H6". Các dòng biểu hiện ổn định DAP12 được phân tích bằng phép phân tích thẩm tách miễn dịch phương Tây và dòng được chọn được đặt tên là "HEK293-DAP12 số 1".

HEK 293 biểu hiện quá mức TREM2 (HEK293-H6) và HEK 293 biểu hiện quá mức GFP (B5) được thu hoạch bằng trypsin 0,05% và ủ ở 37 °C trong 2 giờ. Sau khi ủ, các tế bào này được ly tâm và rửa trong đệm FACS (PBS + BSA 0,5%) hai lần. Các tế bào hỗn hợp được tạo hỗn dịch lại trong đệm FACS với dung dịch Trustain FcX của người (Biolegend, Số hiệu theo Quyển danh mục: 422302) với mật độ 10^6/mL trên mỗi dòng tế bào. Các dòng tế bào hỗn hợp được ươm ở mật độ 200.000 tế bào mỗi giếng trong đĩa đáy tròn 96 giếng và ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng Sau khi ủ, tế bào được ly tâm và ủ với chuẩn độ liều của các kháng thể kháng TREM2 trong 45 phút trên nước đá. Sau khi ủ, các tế bào được ly tâm và rửa bằng đệm FACS ba lần. Sau đó, các tế bào được ủ với kháng thể thứ cấp (Alexa Fluor 647 AffiniPure F(ab')2 Fragment Goat Anti-human IgG (H + L), Jackson ImmunoResearch Laboratories, Số hiệu theo Quyển danh mục: 109-606-088, tỷ lệ pha loãng 1: 800) trong 30 phút trên nước đá. Sau khi ủ, các tế bào được rửa bằng đệm FACS ba lần, tạo hỗn dịch lại trong 100 µL đệm FACS, và phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy (BD FACSCanto II, San Jose, CA), với 30.000 sự kiện thu được cho mỗi mẫu. Cường độ huỳnh quang trung bình trên mỗi tế bào được tính toán bằng phần mềm FlowJo và được sử dụng để tạo đường cong liên kết liều lượng đáp ứng.

Đánh giá mức độ hoạt hóa của quá trình truyền tín hiệu pSyk phụ thuộc TREM2

Mức hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu pSyk phụ thuộc TREM2 được đo trong các tế bào đại thực bào của người hoặc trong các tế bào HEK293-H6 bằng cách sử dụng thử nghiệm AlphaLisa thương mại của Perkin-Elmer.

Đối với tất cả các thí nghiệm liên quan đến việc sử dụng túi lipit chứa DOPC 70% và POPS 30%, các túi lipit được điều chế trong vòng hai tuần sau thí nghiệm như sau: DOPC (1,2-dioleoyl-*sn*-glyxero-3-phosphocholin) 7 mg và POPS (1-palmitoyl-2-oleoyl-*sn*-glyxero-3-phospho-L-serin) 3 mg được trộn trong cloroform trong lọ thủy tinh và được làm khô dưới dòng khí N_2 trong 1-2 giờ, hoặc cho đến khi khô hoàn toàn. Hỗn hợp lipit được tạo hỗn dịch lại trong 1 mL HBSS (để có được nồng độ lipit cuối cùng là khoảng 10 mg/mL) và

được sục xoáy trong 2-3 phút. Sau đó, hỗn dịch lipit được ép đùn bằng máy đùn mini-Avanti được tạo cấu trúc với một màng kích thước lỗ 100 nm để tạo thành các túi đơn lớp nhỏ ở nồng độ 10 mg/mL.

1. Chia liều các kháng thể trong tế bảo

Ngày trước khi thử nghiệm, các tế bào đại thực bào của người hoặc các tế bào HEK293-H6 được dàn mỏng lần lượt với mật độ 100.000 tế bào/giếng hoặc 40.000 tế bào/giếng trên đĩa 96 giếng phủ poly-D-lysin. Các kháng thể được pha loãng trong dịch pha loãng theo dãy nối tiếp 10 điểm với độ pha loãng 3 lần giữa các điểm vào PBS. Đối với đường cong liều lượng đáp ứng của chất đối kháng, các túi lipit chứa DOPC 70% và POPS 30% ở nồng độ cuối cùng 1 mg/mL cũng được lấy vào hỗn hợp kháng thể/PBS. Các tế bào được rửa 3 lần bằng HBSS bằng cách sử dụng máy rửa đĩa Biotek 405/406, sau đó 50 µL mỗi giếng dung dịch kháng thể/PBS (có hoặc không có túi) được thêm vào bằng cách sử dụng bộ xử lý chất lỏng Hamilton Nimbus. Sau đó, đĩa tế bào được chuyển sang thiết bị ủ 37 °C trong 5 phút. Dung dịch liposom/kháng thể được loại bỏ bằng cách lắc nhẹ đĩa và dung dịch đệm phân giải 40 µL Cell Signaling Technologies, CST) chứa PMSF 1 µM được thêm vào bằng cách sử dụng bộ xử lý chất lỏng. Sau đó, sản phẩm phân giải được làm đông lạnh ở -80 °C hoặc được thử nghiệm ngay lập tức trong thử nghiệm AlphaLisa.

Tế bào đại thực bào của người được điều chế cho thử nghiệm như sau. Bạch cầu đơn nhân to của người được phân lập theo quy trình pha chế cocktail giàu bạch cầu đơn nhân to của người RosetteSep (Stemcell Technologies, Số hiệu tham chiếu: 15068) từ máu tươi. Các bạch cầu đơn nhân to đã được phân lập được rửa trong đệm rửa (PBS+FBS 2%) và tạo hỗn dịch lại trong 10 mL đệm phân giải ACK (ThermoFisher Scientific, Số hiệu theo Quyển danh mục: A10492) để phân giải các tế bào hồng cầu. Hai mươi (20) mL dung dịch đệm rửa được thêm vào để dừng quá trình phân giải tế bào, và mẫu được ly tâm và rửa thêm một lần nữa với môi trường nuôi cấy (RPMI, Hyclone FBS 10%, Natri Pyruvat 1%, Glutamax 1%, các axit amin không thiết yếu 1% và Penicillin-streptomycin 1%). Các bạch cầu đơn nhân to của người sau đó được biệt hóa thành tế bào đại thực bào trong môi trường nuôi cấy với sự có mặt của M-CSF tái tổ hợp của người 50 ng/mL (Gibco, Số hiệu theo Quyển danh mục: PHC9501) ở bình cầu dung tích 250 mL. M-CSF mới của người được tăng cường vào ngày thứ 3 và các đại thực bào người sau đó được thu hoạch vào ngày thứ 5 và được sử dụng để thử nghiệm.

2. Thử nghiệm AlphaLisa

Các sản phẩm phân giải tế bào được thử nghiệm về pSyk bằng cách sử dụng quy trình chuẩn dùng cho kit Perkin Elmer pSyk AlphaLisa. Tóm lại, 10 µL sản phẩm phân giải/giếng được chuyển vào đĩa Optiplate trắng đục 384 giếng (Perkin Elmer). Tiếp theo, 5 µL Hỗn hợp nhận (chứa dung dịch làm việc của hòn nhận) được thêm vào mỗi giếng, tiếp theo là bịt kín các đĩa bằng giấy bạc và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, 5 µL Hỗn hợp cho (chứa dung dịch làm việc của các hòn cho) được thêm vào mỗi giếng trong các điều kiện ánh sáng giảm. Các đĩa được bịt kín và ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Cuối cùng, các đĩa được đọc bằng cách sử dụng điều kiện đo AlphaLisa trên đầu đọc đĩa Perkin Elmer EnVision.

Thử nghiệm khả năng sống sót trong các tế bào đại thực bào người

Bạch cầu đơn nhân to của người được phân lập theo quy trình pha chế cocktail giàu bạch cầu đơn nhân to của người RosetteSep (Stemcell Technologies, Số hiệu tham chiếu: 15068). Các bạch cầu đơn nhân to đã được phân lập được rửa trong đệm rửa (PBS+FBS 2%) và tạo hỗn dịch lại trong 10 mL dung dịch phân giải ACK (ThermoFisher Scientific, Số hiệu theo Quyển danh mục: A10492) để phân giải các tế bào hồng cầu. Hai mươi (20) mL dung dịch đệm rửa được thêm vào để dừng quá trình phân giải. Hỗn dịch tế bào được ly tâm và rửa một lần với môi trường nuôi cấy (RPMI 1640 + FBS 10% + penicillin/streptomycin). Các tế bào được tạo hỗn dịch lại trong môi trường nuôi cấy ở mật độ 10^6 tế bào µL/mL và được sử dụng trong thử nghiệm khả năng sống sót được mô tả dưới đây.

Ngày trước khi thử nghiệm, các đĩa 96 giếng đã được phủ trước bằng kháng thể kháng TREM2 hoặc đối chứng kiểu tương đồng cùng loài trong dạng chuẩn độ liều (45 µL/giếng, tổng 12 điểm) và ủ qua đêm ở 4 °C. Sau khi ủ qua đêm, đĩa đã được phủ trước được rửa hai lần bằng PBS và sau đó được nạp các bạch cầu đơn nhân (10^5 tế bào/giếng) với sự có mặt của M-CSF người nồng độ thấp (5 ng/mL, Gibco, Số hiệu theo Quyển danh mục: PHC9501). Sau 5 ngày ở 37 °C, môi trường được hút ra và môi trường 100 µL PBS + 100 µL Celltiter-glo (Promega, Số hiệu theo Quyển danh mục: G7571) được thêm vào mỗi giếng. Sau 10 phút ủ, môi trường tế bào được chuyển sang các đĩa nhiều giếng tương thích để sử dụng phát quang kế, và sự phát quang cho biết khả năng sống sót của tế bào đã được ghi lại.

Thử nghiệm lưu trữ lipit

Trước khi thử nghiệm, các tế bào gốc đa năng được kích thích của người (iPSC) đầu tiên được biệt hóa thành các tế bào tiền thân tạo máu (các HPC) bằng cách sử dụng bộ kit bán sẵn trên thị trường (STEMdiff Hematopoietic Kit của StemCell Technologies). Các HPC được chuyển vào đĩa chứa các tế bào hình sao sơ cấp của người và được đồng nuôi cấy trong 14-21 ngày. Khi các tế bào nổi trên mặt trong dung dịch đồng nuôi cấy được xác định chủ yếu là vi tế bào thần kinh đệm trưởng thành (> 80%), thì vi tế bào thần kinh đệm này được sử dụng để thử nghiệm.

Các tế bào (vi tế bào thần kinh đệm của người được lấy từ iPSC, 30.000 tế bào/giếng) được dàn mỏng trên đĩa 96 giếng được phủ PDL trong môi trường huyết thanh đầy đủ. Sau 24 giờ ở 37°C, môi trường này được trao đổi cho môi trường huyết thanh đầy đủ chứa axit oleic-albumin (nồng độ cuối là 10 µM hoặc 33 µM, Sigma O3008) hoặc myelin được tinh chế, không được đánh dấu (nồng độ cuối 50 µg/ml, được tinh chế từ não chuột nhắt C57Bl/6 kiểu hoang (Jackson Laboratories) bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong tài liệu: Safaiyan *và đồng tác giả* (2016, *Nature Neuroscience* 19(8):995-998)). Sau 24 giờ ở 37°C của quá trình điều trị bằng lipit, môi trường này được trao đổi cho môi trường chứa kháng thể kháng TREM2. Đối với các thử nghiệm điểm đơn lẻ, nồng độ của kháng thể kháng TREM2 được sử dụng là 100nM. Đối với các đường cong liều lượng-đáp ứng, môi trường chứa kháng thể kháng TREM2 100nM được pha loãng theo kiểu nối tiếp 3 lần đối với tổng số là 10 điểm. RSV được sử dụng làm đối chứng. Các tế bào này được ủ trong 48 giờ nữa ở 37°C trước khi lấy hình ảnh các tế bào bằng cách sử dụng chất nhuộm Bodipy, hoặc chiết các tế bào cho phương pháp lipit học, như được mô tả dưới đây.

Đối với phương pháp chụp ảnh Bodipy, dịch nổi được loại bỏ và các tế bào được ủ ở 37 °C trong 30 phút trong đệm tạo ảnh tế bào sống (Life Technologies, Số hiệu theo Quyển danh mục: A14291DJ) chứa 1:2500 của dung dịch Bodipy 493/503 1mg/mL trong DMSO (Thermo-Fisher D3922) và 1 giọt/mL của Nucblue (ThermoFisher, Số hiệu theo Quyển danh mục: R37605). Sau khoảng thời gian ủ này, dung dịch nhuộm được loại bỏ, và các tế bào này được lấy hình ảnh sống hoặc được cố định trong paraformaldehyt 4%. Các tế bào này được lấy hình ảnh bằng cách sử dụng kênh Alexa 488 đối với Bodipy, và DAPI trên máy ảnh đồng tiêu cự hàm lượng cao Opera Phoenix. Các vết lipit được phân tích bằng

cách sử dụng thuật toán tìm vết trên phần mềm Harmony được cung cấp cùng với thiết bị này.

Đối với phương pháp phân tích lipit học, các tế bào được rửa một lần bằng PBS trong khi giữ trong nước đá. 70 µL thể tích dung dịch metanol: nước tỷ lệ 9: 1 bao gồm các chất nội chuẩn tỷ lệ 1: 100 được thêm vào các tế bào trong đĩa 96 giếng. Đĩa được khuấy trên máy lắc ở 4 °C và tốc độ 1200 vòng/phút trong 20 phút và sau đó được ly tâm trong 5 phút ở 300 x g. 50 µL mẫu dịch nổi được chuyển vào các lọ LCMS và giữ ở -80 °C cho đến khi được phân tích trên thiết bị.

Các mức lipit được phân tích bằng sắc ký lỏng (hệ thống Shimadzu Nexera X2, Shimadzu Scientific Instrument, Columbia, MD, Mỹ) kết hợp với đo phổ khối phun điện tử (QTRAP 6500+, Sciex, Framingham, MA, Mỹ). Đối với mỗi lần phân tích, 5 µL mẫu được bơm trên cột BEH C18 1,7 µm, 2,1 × 100 mm (Waters Corporation, Milford, Massachusetts, Mỹ) sử dụng tốc độ dòng 0,25 mL/phút ở 55 °C. Đối với chế độ ion hóa dương, pha động A gồm axetonitril/nước tỷ lệ 60:40 (thể tích/thể tích) với amoni fomat 10 mM + axit fomic 0,1%; pha động B gồm rượu isopropyl/axetonitril tỷ lệ 90:10 (thể tích/thể tích) với amoni fomat 10 mM + axit fomic 0,1%. Đối với chế độ ion hóa âm, pha động A gồm axetonitril/nước tỷ lệ 60:40 (thể tích/thể tích) với amoni axetat 10 mM; pha động B gồm rượu isopropyl/axetonitril tỷ lệ 90:10 (thể tích/thể tích) với amoni axetat 10 mM. Gradien được lập trình như sau: 0,0–8,0 phút từ 45% B đến 99% B, 8,0–9,0 phút ở 99% B, 9,0–9,1 phút đến 45% B và 9,1–10,0 phút ở 45% B. Phương pháp ion hóa phun điện tử được thực hiện ở chế độ ion dương hoặc âm áp dụng các điều kiện đo sau: khí mành chắn ở mức 30; khí va chạm đặt ở mức trung bình; điện áp phun ion ở mức 5500 (chế độ dương) hoặc 4500 (chế độ âm); nhiệt độ ở 250 °C (chế độ dương) hoặc 600 °C (chế độ âm); nguồn ion Khí 1 ở 50; nguồn ion Khí 2 ở 60. Việc thu thập dữ liệu được thực hiện bằng Analyst 1.6.3 (Sciex) ở chế độ giám sát nhiều phản ứng (MRM), với các thông số sau: thời gian dừng (msec) và năng lượng va chạm (CE); điện thế phân rã (DP) ở mức 80; điện thế vào (EP) ở mức 10 (chế độ dương) hoặc -10 (chế độ âm), và điện thế ra của ô va chạm (CXP) ở 12,5 (chế độ dương) hoặc -12,5 (chế độ âm). Lipit được định lượng bằng cách sử dụng hỗn hợp các chất nội chuẩn không nội sinh. Lipit được xác định dựa trên thời gian lưu của chúng và đặc tính MRM của các chất chuẩn tham chiếu có bán trên thị trường (Avanti Polar Lipids, Birmingham, AL, Mỹ).

Hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu mTOR phụ thuộc vào TREM2

Vi tế bào thần kinh đệm của người được lấy từ iPSC kiểu hoang được nuôi cấy và được điều trị bằng kháng thể kháng TREM2 (nồng độ cuối 100 nM) và chất ức chế mTOR thương mại hoặc DMSO (Selleckchem, Số hiệu theo Quyển danh mục: AZD8055, nồng độ cuối 20 nM) trong 96 giờ. Kế tiếp, các tế bào được điều trị này được phân giải, và sản phẩm phân giải tế bào được điều chế cho phương pháp thấm tách phương Tây để nghiên cứu quá trình phosphoryl hóa các đích truyền tín hiệu chính trong con đường mTOR. Các kháng thể sơ cấp dùng cho phương pháp thấm tách phương Tây là thu được từ Cell Signaling Techologies: (1) phospho-mTOR (Ser2448), Số hiệu Sản phẩm: 5536T; (2) mTOR (7C10), Số hiệu Sản phẩm: 2983T; (3) phospho-AKT (Ser473), Số hiệu Sản phẩm: 9271T; (3) phospho-GSK-3beta (Ser9), Số hiệu Sản phẩm: 5558T; (4) protein ribosom phospho-S6 (S235/236), Số hiệu Sản phẩm: 4858T; (5) phospho-4E-BP1 (Thr37/46), Số hiệu Sản phẩm: 2855T; (6) actin beta, Số hiệu Sản phẩm: 58169S.

Ví dụ 5. Các kết quả

Kết quả phân tích các đặc điểm liên kết của các biến thể được làm tương thích với người và được tối ưu hóa trình tự của kháng thể CL0020188 được đưa ra trong Bảng 2 và các Hình 1A-1H. Các mô-típ NG trong trình tự CDR-H2 (SEQ ID NO: 5) và trình tự CDR-L1 (SEQ ID NO: 7) của CL0020188 đã được cải biến, ghép vào các vùng khung của người và phân tích. Bảng 2 đưa ra các trị số K_D được đo bằng Biacore và trị số EC_{50} được đo bằng thử nghiệm liên kết được chuẩn độ liều trong các tế bào HEK293-H6. Các Hình 1A-1H bao gồm các đường cong liều lượng-đáp ứng tiêu biểu về khả năng liên kết vào TREM2 được biểu hiện bởi tế bào HEK293-H6 của các biến thể được làm tương thích với người và được tối ưu hóa trình tự. Các biến thể được biểu diễn bằng các hình tròn đen đặc (•), trong khi các đối chứng kiểu tương đồng cùng loài được biểu diễn bằng các hình tròn trắng để trống (°).

Bảng 2. Các đặc điểm liên kết của các biến thể được tối ưu hóa trình tự và được làm tương thích với người của CL0020188

Dòng	V_H của **người**	V_L của **người**	K_D	EC_{50}
CL0020188-1	**NG**/ghép	**NG**/ghép	2,3 nM	0,42 nM
CL0020188-2	**NG**/3m	**NG**/ghép	3,4 nM	0,26 nM
CL0020188-3	**NG**/ghép	**TG**/ghép	6,8 nM	0,64 nM
CL0020188-4	**NG**/3m	**TG**/ghép	4,8 nM	0,44 nM
CL0020188-5	**NA**/ghép	**NG**/ghép	5,1 nM	0,45 nM
CL0020188-6	**NA**/3m	**NG**/ghép	4,0 nM	0,31 nM
CL0020188-7	**NA**/ghép	**TG**/ghép	10 nM	0,68 nM
CL0020188-8	**NA**/3m	**TG**/ghép	7,3 nM	0,51 nM
Kháng thể mẹ			9,5 nM	0,44 nM

3m = A24G/L45P/V48L trong V_H

Như được minh họa trong Bảng 2, các dòng được làm tương thích với người và được tối ưu hóa trình tự của CL00201088 thể hiện các trị số ái lực tương tự đối với TREM2 của người so với kháng thể mẹ (K_D = 9,5 nM), như được đo bằng Biacore. Điều này phù hợp với kết quả liên kết tế bào trong các tế bào HEK293-H6, được minh họa trong Bảng 1, bằng các đường cong liều lượng-đáp ứng tương ứng được đưa ra trên các Hình 1A-1H. So với kháng thể mẹ (EC_{50} = 0,44 nM), các dòng được làm tương thích với người và được tối ưu hóa trình tự có ái lực có thể so sánh được và dưới mức nanomol đối với TREM2 được biểu hiện ở các tế bào HEK293-H6. Chung quy lại, các kết quả này biểu lộ động học liên kết có thể so sánh được giữa kháng thể mẹ và các biến thể được làm tương thích với người và được tối ưu hóa trình tự.

Các kết quả của các biến thể ATV:TREM2 được mô tả ở Ví dụ 3 được tổng kết trong Bảng 3 dưới đây. Đường cong về khả năng liên kết tế bào làm ví dụ dựa trên khả năng liên kết vào các tế bào HEK biểu hiện TREM2 của người và phép phân tích bằng FACS được minh họa trên Hình 2.

Bảng 3. Phần tổng kết về các đặc điểm ATV:TREM2

ATV:TREM2	K_D theo Biacore (nM)			EC50 (nM)
	TREM2 của người	TREM2 của khỉ đuôi dài	TfR của người	HEK TREM2 của người
số 1	TBD	TBD	TBD	TBD
số 2	5,4	2,4	650	4,9
số 3	3,0	2,2	1400	4,6
số 4	2,0	2,2	TBD	TBD
số 5	5,7	2,4	620	3,6

TBD = sẽ được xác định

Các kháng thể này cũng được đánh giá về quá trình truyền tín hiệu pSyk phụ thuộc vào TREM2 trong tế bào HEK-H6, năng lực thúc đẩy mức sống sót của các tế bào đại thực bào của người, và khả năng điều biến mức tích tụ lipit trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm của người được lấy từ iPSC (sau đây được viện dẫn là "vi tế bào thần kinh đệm iPSC" hoặc "iMG"). Hình 3 minh họa các kết quả của biến thể ATV:TREM2 (ATV:TREM2 số 3) và kháng thể kháng TREM2 tương ứng. ATV:TREM2 có thể hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu pSyk trong tế bào HEK293-H6 biểu hiện TREM2 đến một mức độ lớn hơn một cách đáng kể so với kháng thể TREM2 tương ứng, biểu lộ rằng việc thêm ATV vào phân tử có thể làm tăng độ công hiệu của nó (Hình 3). Ngoài ra, ATV:TREM2 đã kích thích mức sống sót của đại thực bào với EC_{50} là 4,1 + 0,3 nM. Cuối cùng, kháng thể kháng TREM2 đã chứng minh năng lực trong việc làm giảm mức tích tụ lipit trong iMG được điều trị bằng myelin (các Hình 4A và 4B) với IC_{50} về khả năng ức chế mức lưu trữ lipit là 0,20 nM (mức ức chế tối đa 97,7 + 0,3 %).

Các nghiên cứu phụ thêm được thực hiện để nghiên cứu khả năng của ATV:TREM2 trong việc làm giảm mức tích tụ lipit. Các Hình 5A-5F và các Hình 6A-6C thể hiện rằng biến thể ATV:TREM2 tiêu biểu (ATV:TREM2 số 3) làm giảm mức tích tụ lipit trong khi tăng cường chất trung gian oxy hóa axit béo, cho thấy vai trò tiềm năng của ATV:TREM2 trong việc tăng cường chức năng ty lạp thể. Các tế bào (iMG) được điều trị bằng dạng thử thách lipit axit oleic (33 μM) sau đó là, quá trình ủ với ATV:TREM2 có thể làm giảm mức tích tụ lipit, như được minh họa bằng phương pháp nhuộm Bodipy (các Hình 5A và 5B). Phép phân tích LCMS về iMG được điều trị bằng myelin trong 24 giờ, sau đó là, quá trình ủ với

ATV:TREM2 trong 48 giờ, đã biểu lộ rằng ATV:TREM2 làm giảm loại triglyxerit (TG) trong khi đồng thời, làm tăng chất trung gian oxy hóa beta (axyl carnitin) và chất trung gian chu trình TCA (các Hình 5C-5F). Hình 5C đưa ra bản đồ nhiệt thể hiện tất cả các loại chất trung gian TG, axyl carnitin, và chu trình TCA mà minh họa mức thay đổi gấp số lần là > 1,5 ($p < 0,05$), trong khi các Hình 5D-5F minh họa các thay đổi của các loại tiêu biểu trong chất dẫn và iMG được thử thách myelin mà được ủ với ATV:TREM2 hoặc đối chứng kiểu tương đồng cùng loài sau thử thách. Các Hình 6A-6C minh họa các thay đổi của các loại chất trung gian TG, axyl carnitin và chu trình TCA cụ thể trong iMG được ủ với ATV:TREM2 hoặc đối chứng kiểu tương đồng cùng loài sau thử thách myelin. Như được trình bày trên các Hình 6A-6C, ATV:TREM2 làm giảm tất cả các loại của TG và xeramit trong khi làm tăng các loại nhất định của axyl carnitin chuỗi ngắn, biểu lộ rằng ATV:TREM2 có thể tăng cường chức năng ty lạp thể.

Hiện tượng tăng sinh tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm là gắn liền với hiện tượng hoạt hóa và gài tín hiệu mTOR. Vì vậy, đã khám phá ra vai trò của ATV:TREM2 trong quá trình truyền tín hiệu con đường mTOR phía cuối nguồn. Trạng thái phosphoryl hóa của các đích con đường tín hiệu mTOR được phân tích bằng phương pháp thấm tách phương Tây trong vi tế bào thần kinh đệm iPSC kiểu hoang được ủ với biến thể ATV:TREM2 tiêu biểu (ATV:TREM2 số 3) khi có mặt và thiếu vắng chất ức chế mTOR. Hình 7A minh họa các hình ảnh của phương pháp thấm tách phương Tây tiêu biểu của các đích con đường tín hiệu mTOR. Quá trình định lượng của dữ liệu phương pháp thấm tách phương Tây được đưa ra trên các Hình 7B-7E (các mức phosphoryl hóa được chuẩn hóa theo đối chứng nạp actin beta). Các mức phosphoryl hóa của mỗi mẫu được điều trị bằng ATV:TREM2 được đem so sánh với các mẫu được điều trị bằng đối chứng kháng thể kiểu tương đồng cùng loài đối với mỗi thử nghiệm độc lập (n=6). Các kết quả này thể hiện rằng ATV:TREM2 hoạt hóa quá trình truyền tín hiệu con đường mTOR, như được minh chứng bằng các mức phosphoryl hóa tăng của mTOR ở serin^{2488}, AKT ở serin^{473}, protein ribosom S6 (RPS6) ở serin$^{235/236}$, và GSK3b ở serin^{9} trong các mẫu được điều trị bằng ATV:TREM2 so với các đối chứng kiểu tương đồng cùng loài (các Hình 7B-7E; phần tổng kết thống kê: "ns" ($p>0,05$); "*" ($p<0,01$); "**" ($p<0,001$)). RPS6 là đích tín hiệu, đây là phía cuối nguồn của phức hợp mTORC1, và GSK3b là đích tín hiệu, đây là phía cuối nguồn của phức hợp mTORC2. Đối với tất cả các dữ liệu được tạo ra trên các Hình 5A đến 7E, đối chứng kiểu

tương đồng cùng loài ("ISO") của ATV:TREM2 số 3 chứa các trình tự được đưa ra trong Bảng 5.

Ví dụ 6. Vai trò của ATV:TREM2 trong tình trạng loạn chức năng thể tiêu bào

Vai trò của ATV:TREM2 trong chức năng thể tiêu bào được nghiên cứu. Để đánh giá ảnh hưởng đối với chức năng thể tiêu bào, các mức của progranulin (PGRN) và bis(monoaxylglyxero)phosphat (BMP) được đo trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC ("iMG") được điều trị bằng biến thể ATV:TREM2.

Để đánh giá tác dụng của ATV:TREM2 đối với các mức PGRN, iMG được dàn mỏng ở mật độ là 30.000 tế bào trong mỗi giếng trong đĩa 96 giếng, và được ủ với ATV:TREM2 số 3 (100 nM) trong 72 giờ, sau đó dịch nổi của tế bào và sản phẩm phân giải tế bào được thu gom và được phân tích về các mức progranulin (PGRN) bằng cách sử dụng ELISA bánh kẹp so màu.

Đối với việc đo các mức PGRN, các đĩa MaxiSorp 384 giếng Thermo Scientific được phủ bằng kháng thể bắt 4 µg/mL (kháng thể kháng PGRN của R&D từ kit DuoSet ELISA, Số hiệu theo Quyển danh mục: DY2420) được pha loãng trong dung dịch muối được đệm phosphat (phosphate buffered saline-PBS) và được ủ qua đêm ở 4˚C. Các giếng chứa mẫu được phong bế trong 90 phút bằng BSA 3% trong PBS. Các mẫu tế bào được pha loãng 1:10 trong BSA 3% trong PBS và được thêm vào mỗi giếng chứa mẫu trên đĩa, sau đó là quá trình ủ trong 90 phút ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện (kháng thể kháng PGRN của R&D từ kit DuoSet ELISA, Số hiệu theo Quyển danh mục: DY2420) được pha loãng đến 125 ng/mL, kế tiếp, được thêm vào mỗi giếng chứa mẫu, và đĩa được ủ trong 90 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau cùng là, Streptavidin được tiếp hợp với HRP (SA-HRP của R&D từ kit DuoSet ELISA, Số hiệu theo Quyển danh mục: DY2420) được pha loãng 1:200 và được thêm vào mỗi giếng chứa mẫu. Đĩa được ủ trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa các giếng chứa mẫu bằng PBS, chất phản ứng làm hiện màu (chất nền TMB) được thêm và được phép phản ứng trong 5 phút trước khi phản ứng này được dừng bằng H_2SO_4 4 N. Độ hấp thụ được đo bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa BioTek Synergy Neo2, và các mức PGRN được xác định bằng phép nội suy từ đường chuẩn được làm khớp với đường cong logistic bốn thông số. Như được minh họa trên Hình 8, quá trình ủ với ATV:TREM2 đã làm tăng các mức PGRN trong cả dịch nổi và sản phẩm phân giải tế bào so với đối chứng kiểu tương đồng cùng loài.

Để đánh giá tác dụng đối với các mức BMP, iMG được thử thách bằng myelin hoặc chất dẫn trong 24 giờ, sau đó là, quá trình ủ với ATV:TREM2 số 3 (100 nM) trong 48 giờ. Các lipit tế bào được chiết thông qua việc thêm metanol chứa hỗn hợp chất nội chuẩn và độ dồi dào BMP được đo bằng sắc ký lỏng-phép đo phổ khối (LC-MS/MS) trên Q-trap 6500 (SCIEX) tương tự với loại được mô tả trong tài liệu: Công bố Đơn PCT Quốc tế số WO 2020/112889. Các loại BMP được định lượng bằng cách sử dụng BMP(14:0_14:0) làm chất nội chuẩn và được nhận diện dựa trên thời gian lưu và các thuộc tính MRM của chúng. Quá trình định lượng được thực hiện bằng cách sử dụng MultiQuant 3.02 (Sciex) sau khi chỉnh sửa đối với hiện tượng chồng lấn đồng vị. Các loại BMP được chuẩn hóa theo hàm lượng lipit trung vị của tất cả các loại được đo. Nồng độ protein được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm axit bicinchoninic (bicinchoninic acid-BCA) (Pierce, Rockford, IL, Hoa Kỳ). Một kết quả BMP tiêu biểu được minh họa trên Hình 9. Như được thể hiện trên Hình 9, iMG được thử thách bằng myelin và kế tiếp, được điều trị bằng ATV:TREM2 làm giảm mức của các loại BMP, cho thấy sự giải cứu tiềm năng của thử thách thể tiêu bào do myelin kích thích.

Như được minh họa trên các Hình 8 và 9, quá trình ủ iMG bằng ATV:TREM2 làm tăng các mức PGRN và chỉnh sửa các mức BMP do myelin kích thích, biểu lộ vai trò của ATV:TREM2 trong việc điều biến tác dụng của thể tiêu bào. Trên các Hình 8 và 9, đối chứng kiểu tương đồng cùng loài (ISO) của ATV:TREM2 số 3 chứa các trình tự được đưa ra trong Bảng 5.

Ví dụ 7. Vai trò của ATV:TREM2 trong quá trình hô hấp ty lạp thể

Để đánh giá ảnh hưởng đối với quá trình hô hấp ty lạp thể, mức tiêu thụ oxy được đo trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC ("iMG") được điều trị bằng biến thể ATV:TREM2 hoặc đối chứng kiểu tương đồng cùng loài bằng cách sử dụng thiết bị phân tích Seahorse XFe96 (Agilent) và bằng cách sử dụng các chất liệu và quy trình từ Seahorse XF Palmitate Oxidation Stress Kit (Agilent 103693). Các tế bào được nuôi cấy trên vi đĩa XF96 (Agilent, Số hiệu theo quyển danh mục: 102416) có ATV:TREM2 số 3 (100 nM) hoặc đối chứng kiểu tương đồng cùng loài trong 72 giờ trước thử nghiệm Seahorse. Các tế bào phải được đưa vào môi trường làm giới hạn chất nền được hợp thành từ Seahorse XF RPMI (Agilent 103576) được bổ sung glucoza 0,5 mM (Agilent 103577), glutamin 1 mM (Agilent 103579), L-carnitin 0,5 mM (một phần của Seahorse XF Palmitate Oxidation

Stress Kit), và Hyclone FBS 1% 16 giờ trước thử nghiệm Seahorse. Các tế bào được cho dùng theo liều lượng bằng thể tiếp hợp palmitat-BSA (166 µM) hoặc đối chứng BSA ngay trước thử nghiệm này. Cách tiêm liên tiếp (1) etomoxir (4 µM) (chất ức chế carnitin palmitoyltransferaza 1 (CPT1)) hoặc chất dẫn, (2) oligomycin (1,5 µM) (chất ức chế phức hợp ATP syntaza V), (3) Carbonyl xyanua 4-(triflometoxy)phenylhydrazon (FCCP, chất làm tách rời ty lạp thể, 1 µM), và (4) rotenon/antimycin (mỗi loại 0,5 mM, lần lượt là các chất ức chế phức hợp I và phức hợp III) được sử dụng để đánh giá dung tích hô hấp ty lạp thể của các tế bào. Tốc độ tiêu thụ oxy được đo trong suốt tiến trình của thử nghiệm bằng thiết bị phân tích Seahorse (Agilent). Phần tổng kết về các điều kiện thử nghiệm dùng để đánh giá quá trình hô hấp ty lạp thể được đưa ra trong Bảng 4.

Bảng 4. Các điều kiện thử nghiệm

Điều kiện	**Kháng thể**	**Chất ức chế CPT1**	**Chất nền thu hồi**
1	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài	Etoxomir	BSA (đối chứng)
2	ATV:TREM2	Chất dẫn	BSA (đối chứng))
3	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài	Etoxomir	Axit palmitic (PAL)
4	ATV:TREM2	Chất dẫn	Axit palmitic (PAL)
5	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài	Etoxomir	BSA (đối chứng)
6	ATV:TREM2	Chất dẫn	BSA (đối chứng))
7	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài	Etoxomir	Axit palmitic (PAL)
8	ATV:TREM2	Chất dẫn	Axit palmitic (PAL)

Một biểu đồ động học tiêu biểu về mức tiêu thụ oxy được minh họa trên Hình 10A, và biểu đồ dạng cột minh họa dung tích hô hấp tối đa của các tế bào được đưa ra trên Hình 10B. Như được thể hiện trên các Hình này, ATV:TREM2 làm tăng mức hô hấp tối đa đến mức

độ tương tự với mức hô hấp tối đa của chất nền axit béo axit palmitic (PAL). Tác dụng này được giảm bớt khi có mặt chất ức chế CPT1. Các kết quả này biểu lộ rằng ATV:TREM2 tăng cường mức hô hấp ty lạp thể tối đa và rằng tác dụng này dường như là do dung tích oxy hóa axit béo được tăng cường đem lại.

Ví dụ 8. Các thuộc tính có tính so sánh của ATV:TREM2

Các thuộc tính của ATV:TREM2 số 1 và ATV:TREM2 số 3 được đem so sánh với các thuộc tính của các kháng thể tham chiếu mà liên kết TREM2, phần này được mô tả trong tài liệu: WO 2019/028292. Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể tham chiếu số 1 ("Ref. Ab. số 1") được biểu diễn lần lượt bằng các SEQ ID NO:74 và 75. Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể tham chiếu số 2 ("Ref. Ab. số 2") được biểu diễn bằng lần lượt bằng các SEQ ID NO:76 và 75. Các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của mỗi kháng thể kháng TREM2 được đưa ra trong Bảng 5.

Bảng 5. Các trình tự của đối chứng kiểu tương đồng cùng loài

Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài	**Chuỗi nặng thứ nhất**	**Chuỗi nặng thứ hai**	**Chuỗi nhẹ**
ISO của kháng thể tham chiếu số 1 và số 2	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:77	SEQ ID NO:78
ISO của ATV:TREM2 số 1	SEQ ID NO:79	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82
ISO của ATV:TREM2 số 3	SEQ ID NO:80	SEQ ID NO:81	SEQ ID NO:82

ATV:TREM2 thì công hiệu hơn in vitro và kích thích ít viêm hơn (ít giải phóng xytokin hơn) so với các Ab tham chiếu

Kháng thể kháng TREM2 được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm mức sống sót của tế bào đại thực bào của người được mô tả ở Ví dụ 4. Hình 11A minh họa các đường cong liều lượng-đáp ứng về khả năng sống của tế bào với kháng thể kháng TREM2, mà "ISO" được dùng để chỉ đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của ATV:TREM2 số 3 (Bảng 5). Các trị số về độ công hiệu (EC50) và đáp ứng tối đa (Emax) tương ứng như được xác định

từ các đường cong liều lượng-đáp ứng được đưa ra trên các Hình 11B và 11C; các dấu riêng biệt biểu diễn các trị số đơn lẻ từ các đối tượng cho tế bào của người (n=3). Các kết quả được đưa ra trên các Hình 11A-11C biểu lộ rằng ATV:TREM2 số 3 thì công hiệu hơn trong việc thúc đẩy mức sống sót của đại thực bào của người *in vitro* so với các kháng thể tham chiếu số 1 và số 2.

Trong một thử nghiệm tách biệt, các tế bào đại thực bào của người được điều trị bằng 100 nM của kháng thể kháng TREM2 được làm bất động ở bề mặt trong năm ngày, sau đó, các môi trường nuôi cấy tế bào dùng cho mỗi tập hợp của các tế bào được thu gom và được phân tích về mức giải phóng xytokin bằng cách sử dụng công nghệ Luminex xMAP và kit thử nghiệm đa mục tiêu trên cơ sở hòn thương mại (Human Cytokine 42-Plex Discovery Assay®, Eve Technologies Corp.). Bản đồ nhiệt về mức giải phóng xytokin tương đối được minh họa trên Hình 12 (điểm số Z được sử dụng cho việc vẽ đồ thị). Các kết quả trên Hình 12 minh họa rằng ATV:TREM2 số 3 kích thích ít viêm hơn trong tế bào đại thực bào của người so với các kháng thể tham chiếu số 1 và số 2.

Nói tóm lại, ATV:TREM2 số 3, kháng thể tham chiếu số 1, và kháng thể tham chiếu số 2 có thể thúc đẩy mức sống sót và tăng sinh của đại thực bào của người (Hình 11A). Tuy nhiên, ATV:TREM2 số 3 thể hiện độ công hiệu mạnh hơn đối với mức sống sót của tế bào với chỉ dấu xytokin tổng thể giảm so với các kháng thể tham chiếu số 1 và số 2 (các Hình 11B, 11C, và 12).

ATV:TREM2 có thể làm giảm các mức loại triglyxerit sau khi thử thách

Kháng thể kháng TREM2 được đánh giá bằng thử nghiệm lưu trữ lipit (bằng cách sử dụng thử thách axit oleic 10 μM) như được mô tả ở Ví dụ 4. Các kết quả của ATV:TREM2 số 3, kháng thể tham chiếu số 1, và kháng thể tham chiếu số 2 được đưa ra trên các Hình 13A-13E.

Các Hình 13A-13C minh họa các đồ thị dạng núi lửa phun có các ngưỡng là $p < 0,05$ và mức thay đổi gấp số lần > 1,5 của loại triglyxerit trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC ("iMG") như được định lượng bằng LCMS. Dữ liệu này được chuẩn hóa theo đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của mỗi kháng thể. Như được thể hiện trên các Hình 13A-13C, ATV:TREM2 số 3 có thể điều biến loại triglyxerit (TG) sau khi cho dùng axit oleic theo liều lượng, trong khi các kháng thể tham chiếu đã không thay đổi một cách đáng kể các mức của loại TG sau khi thử thách axit oleic. Các Hình 13D và 13E minh họa

biểu đồ dạng cột về phương pháp đo các loại TG tiêu biểu, có dữ liệu được chuẩn hóa theo đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của ATV:TREM2 số 3.

ATV:TREM2 có thể điều biến các mức TREM2 in vitro

Để đánh giá tình trạng kháng thể kháng TREM2 ảnh hưởng đến các mức TREM2 trong tế bào dạng vi tế bào thần kinh đệm được lấy từ iPSC ("iMG") như thế nào, iMG được ủ với ATV:TREM2 số 3 hoặc kháng thể tham chiếu số 1 trong 72 giờ ở các nồng độ khác nhau, sau đó là đo các mức TREM2 trong sản phẩm phân giải tế bào iMG và môi trường nuôi cấy tế bào. TREM2 được đo như sau. Nói một cách vắn tắt, các đĩa streptavidin đốm nhỏ MSD (Meso Scale Discovery) được phủ bằng kháng thể đa dòng của dê kháng TREM2 của người được biotin hóa (R&D Systems, BAF1828) ở nhiệt độ trong phòng trong 1 giờ. Sau đó, các đĩa này được phong bế bằng dung dịch đệm MSD Block A (Meso Scale Discovery) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Các mẫu và các chất chuẩn được điều chế/pha loãng bằng dung dịch đệm thử nghiệm (dung dịch đệm MSD Block A 25% trong TBST), và 30 µL của các mẫu và các chất chuẩn được nạp vào đĩa này sau khi phong bế. Sau 1 giờ ủ ở nhiệt độ trong phòng, các đĩa này được rửa bằng TBST và sau đó là liên kết kháng thể sơ cấp (ATV:TREM2 số 3) trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau đó, IgG của dê kháng của người được gắn thẻ sulfo được pha loãng (Southern Biotech, 2049-01) được thêm vào các đĩa, và được ủ trong một giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa bằng TBST, các đĩa MSD được làm hiện màu bằng cách sử dụng dung dịch đệm đọc T MSD 2x, sau đó là phát hiện bằng cách sử dụng thiết bị đọc đĩa MSD Sector. Trị số MSD được chuyển đổi thành các số lượng tuyệt đối của TREM2 bằng cách làm khớp đường chuẩn bằng cách sử dụng phần mềm Meso Scale Discovery (Discovery Workbench).

Các Hình 14A và 14B thể hiện các đồ thị về các mức TREM2 ở dạng hàm số của nồng độ kháng thể trong sản phẩm phân giải tế bào iMG và các môi trường nuôi cấy tế bào sau khi ủ với kháng thể kháng TREM2. Các mức TREM2 của mỗi kháng thể được chuẩn hóa theo đối chứng kiểu tương đồng cùng loài cụ thể của chúng. Trên các Hình 14A và 14B, "ISO" biểu diễn đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của ATV:TREM2 số 3. Như được minh họa trên Hình 14A, các mức của TREM2 tổng tăng với các lượng tăng dần của kháng thể trong sản phẩm phân giải tế bào của iMG được điều trị bằng ATV:TREM2 số 3 và kháng thể tham chiếu số 1. Ngược lại, các mức của TREM2 tan được giảm với các lượng tăng

dần của kháng thể trong các môi trường nuôi cấy tế bào của các tế bào được điều trị bằng kháng thể.

ATV:TREM2 biểu hiện profin dược động ưu việt ở các động vật linh trưởng không phải người

Các thuộc tính dược động (PK) của kháng thể kháng TREM2 được nghiên cứu ở các động vật linh trưởng không phải người. Nói một cách vắn tắt, khỉ đuôi dài đực trưởng thành/trưởng thành trẻ có độ tuổi nằm trong khoảng từ 36 đến 53 tháng được cho dùng theo kiểu trong tĩnh mạch một liều lượng đơn lẻ của vật dụng thử nghiệm 30mg/kg (Bảng 6, n=5 cho mỗi đoàn hệ). Các mẫu CSF được thu gom ở thời điểm 24, 168, và 336 giờ sau liều lượng.

Các kết quả được minh họa trong Bảng 6 và Hình 15. Bảng 6 thể hiện trị số PK của kháng thể kháng TREM2 trong dịch não-tủy (cerebrospinal fluid-CSF) của các động vật linh trưởng không phải người. Trị số PK của các biến thể ATV:TREM2 thể hiện rằng các kháng thể này có mức tiếp xúc cao hơn trong CSF so với Ab TREM2 (thiếu khả năng liên kết đối với thụ thể transferin; các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được biểu diễn lần lượt bằng các SEQ ID NO: 83 và 54) và kháng thể tham chiếu số 1.

Bảng 6. Profin dược động CSF của kháng thể kháng TREM2 ở các động vật linh trưởng không phải người

Vật dụng thử nghiệm	**Liều lượng (mg/kg)**	**$C_{tối\ đa}$ (nM)**	**$T_{tối\ đa}$ (giờ)**	**$AUC_{0\text{-sau cùng}}$ (nM*giờ)**
ATV:TREM2 số 1	30	3,17	24	822,59
ATV:TREM2 số 3	30	1,49	24	461,79
ISO*	30	3,23	24	618,90
Ab TREM2	30	0,98	24	280,38
Kháng thể tham chiếu số 1	30	0,70	24	166,69

* Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của ATV:TREM2 số 1

Hình 15 minh họa các profin PK của kháng thể kháng TREM2 trong CSF của các động vật linh trưởng không phải người được cho dùng theo liều lượng. Như được minh họa trên Hình 15 và Bảng 6, ATV:TREM2 thể hiện ít nhất mức tăng 2 lần về PK CSF so với kháng thể tham chiếu số 1.

Ví dụ 9. Các thuộc tính ATV:TREM2 ở chuột nhắt TREM2 được làm tương thích với người

Để nghiên cứu tác dụng của ATV:TREM2 in vivo, chúng tôi đã tạo ra chuột nhắt chuyển gen BAC mà biểu hiện TREM2 của người. Các con chuột này được lai giống với chuột nhắt chèn thêm thụ thể transferin của người được mô tả trong tài liệu: Bằng Sáng chế Hoa Kỳ số 10,143,187 để cho phép xác định đặc điểm các phân tử ATV:TREM2 được mô tả trong bản mô tả này.

Tạo ra mô hình chuyển gen BAC TREM2 của người

Để nghiên cứu tác dụng của ATV:TREM2 in vivo, chúng tôi đã tạo ra một vài dòng chuột nhắt chuyển gen biểu hiện TREM2 của người bằng cách sử dụng BAC DNA CTD-2210D2 được cải biến (ThermoFisher Scientific; Số hiệu theo quyển danh mục: 96012). Trong BAC DNA CTD-2210D2 ban đầu, vùng mã hóa TREM2 của người và các yếu tố điều hòa của nó được kẹp vào giữa bởi hai gen giống TREM khác, TREML1 và TREML2. Để tránh hiện tượng cản trở từ các gen giống TREM này, chúng tôi đã phá bỏ quá trình biểu hiện của chúng bằng cách xóa bỏ exon 1 khỏi TREML1 và exon 3 khỏi TREML2. Cấu trúc BAC CTD-2210D2 DNA được thao tác này được tiêm vào tiền nhân của trứng chuột nhắt được thụ tinh từ chuột nhắt C57BL/6J. Hai dòng nhận chuyển gen độc lập (được đặt tên là TB36 và TB45) là thu được và được thể hiện là có hiện tượng truyền dòng mầm.

Để xác định đặc điểm và so sánh hai dòng chuyển gen này, các con vật chuyển gen bán hợp tử và các đối chứng cùng lứa không chuyển gen kiểu hoang được sử dụng cho phép phân tích. Số lượng bản sao TREM2 của người được xác định bằng cách sử dụng phép phân tích qPCR về ADN hệ gen đuôi. Các mức protein và mARN TREM2 của người được đo ở não, gan, phổi, và lá lách bằng qRT-PCR và thử nghiệm MSD. Các mARN TREML1 và TREML2 của người được phân tích ở vi tế bào thần kinh đệm được phân loại trong não bằng qRT-PCR. Mức biểu hiện TREM2 bề mặt được định lượng bằng FACS ở đại thực

bào được lấy từ tủy xương (BMDM). Chức năng của TREM2 của người được đánh giá bằng thử nghiệm mức sống sót BMDM in vitro.

TREML1 và TREML2 của người là không thể phát hiện được ở TB36 hoặc TB45, thể hiện sự xóa bỏ thành công các gen này. Phép phân tích qPCR thể hiện rằng có hai và một bản sao của các gen chuyển TREM2 của người lần lượt ở TB36 và TB45, có mức biểu hiện TREM2 của người cao hơn tương ứng ở TB36 so với TB45 ở não và các mô ngoại vi. Thử nghiệm mức sống sót in vitro này thể hiện rằng các kháng thể chất chủ vận TREM2 của người khởi động các đáp ứng mạnh hơn ở dòng TB36 so với ở dòng TB45.

Dựa trên quá trình xác định đặc điểm ex vivo và in vitro này, chúng tôi đã chọn lựa TB36 cho các nghiên cứu nhân giống và in vivo sau đây. Chuột nhắt TB36 bán hợp tử được lai ngược trở lại thêm với C57BL/6J trong ba vòng và sau đó, được nhân giống với chuột nhắt chèn thêm TfR của người (được mô tả trong tài liệu: Bằng Sáng chế Hoa Kỳ số 10,143,187) để tạo ra dạng bán hợp tử BAC TREM2 của người; chuột nhắt đồng hợp tử chèn thêm TfR của người dùng cho các nghiên cứu in vivo.

Các đáp ứng dược động học và dược lực học với ATV:TREM2 ở chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người

Để xác định xem liệu ATV:TREM2 có thể khởi động đáp ứng vi tế bào thần kinh đệm in vivo hay không, một liều lượng đơn lẻ của ATV:TREM2 số 3 hoặc đối chứng kiểu tương đồng cùng loài tương ứng (ATV:RSV) (100mg/kg) được cho dùng theo kiểu trong tĩnh mạch đối với chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người ở thời điểm ngày 0, và chuột nhắt được làm chết ở thời điểm ngày 1 hoặc ngày 4 sau liều lượng dùng cho phép phân tích ex vivo. Vào thời điểm làm chết, các con vật được gây mê bằng phương pháp tiêm trong màng bụng bằng Avertin 2,5%. Máu cuối được thu gom thông qua phương pháp chọc dò tim trong ống EDTA có sự lật ngược chậm (10 lần) và sau đó, được ly tâm ở mức 15.350 g trong 7 phút ở 4°C. Huyết tương (lớp trên cùng) được chuyển sang ống Eppendorf 1,5 ml và được lưu trữ ở -80°C cho đến khi đo. Sau khi thu gom máu, các mẫu CSF được thu gom bằng các ống mao dẫn thủy tinh đã được kéo giãn trước từ vùng bể lớn và sau đó, được chuyển sang ống Protein LoBind Eppendorf 0,5 mL để ly tâm ở mức 12.700 vòng/phút trong 7 phút ở 4°C. Dịch nổi của các mẫu CSF được cấp đông trên nước đá khô và được lưu trữ ở -80°C cho đến khi đo. Sau đó, các con vật này được truyền dịch bằng PBS lạnh, và não được phẫu tích ra, và hai bán cầu được tách. Nửa não dọc bên phải được cố định

bằng phương pháp nhận chìm trong paraformaldehyt 4% ở 4°C trong 24 giờ và sau đó, được chuyển sang dung dịch muối được đệm phosphat (phosphate buffered saline-PBS) có natri azit 0,1% để lưu trữ cho đến khi sẵn sàng cho việc chế biến bằng sucroza 30% và cắt lát. Nửa não dọc bên trái được cắt thành hai miếng và được cấp đông trong hai ống lần lượt dùng cho việc đo PK và các phân tích độ gài với đích/xytokin khác.

Các mức trong huyết tương và não của IgG của người được đánh giá ở thời điểm 1 ngày và 4 ngày sau liều lượng và được thể hiện trong Bảng 7 dưới đây.

Bảng 7. Profin dược động huyết tương và não ở chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người

TB36 * chèn thêm TfR của người	**Huyết tương**		**Não**	
	ATV:RSV [hIgG] uM	**ATV:188-14 [hIgG] uM**	**ATV:RSV [hIgG] nM**	**ATV:188-14 [hIgG] nM**
24 giờ	2,96 ± 0,17	1,78 ± 0,073	34,1 ± 3,2	24,4 ± 1,6
96 giờ	0,401 ± 0,074	0,29 ± 0,013	13,8 ± 1,8	6,67 ± 1,0

Tác dụng của ATV:TREM2 đối với mức tăng sinh vi tế bào thần kinh đệm

Bốn liều lượng của 5-Etynyl-2′-deoxyuridin (EdU, 80mg/kg), một chất đồng đẳng thymidin mà có thể được sáp nhập vào ADN mới được tổng hợp, được cho dùng theo kiểu trong màng bụng đối với chuột nhắt ở thời điểm ngày 0, ngày 1, ngày 2 và ngày 3 sau khi điều trị ATV:TREM2 số 3 hoặc ATV:RSV ở thời điểm ngày 0.

Đối với việc phát hiện vi tế bào thần kinh đệm tăng sinh (EdU+Iba1+), các lát cắt não ở thời điểm ngày 4 sau liều lượng được điều trị bằng kit lấy hình ảnh EdU Click-iT (ThermoFisher Scientific, C10637), sau đó là phương pháp nhuộm miễn dịch Iba1. Phương pháp nhuộm EdU-Iba1 thể hiện rằng ATV:TREM2 làm tăng mạnh số lượng vi tế bào thần kinh đệm mới sinh (EdU+ Iba1+; Hình 16A) và tổng diện tích bao phủ vi tế bào thần kinh đệm (diện tích Iba1+; Hình 16B) ở não so với đối chứng kiểu tương đồng cùng loài, vì vậy thể hiện rằng ATV:TREM2 làm tăng một cách đáng kể mức tăng sinh vi tế bào thần kinh đệm so với đối chứng.

ATV:TREM2 thì công hiệu đối với mức tăng sinh vi tế bào thần kinh đệm hơn nhiều, so với các kháng thể không ATV TREM2 ở mô hình chuột nhắt

Để xác định liều dùng hữu hiệu thấp nhất của ATV:TREM2 và để so sánh với các kháng thể không ATV TREM2, một liều lượng đơn lẻ của ATV:TREM2 số 3 (1, 3, 10, 30mg/kg) hoặc kháng thể TREM2 tham chiếu tương ứng ("Ab TREM2;" 30mg/kg), kháng thể tham chiếu số 2 (30mg/kg) hoặc đối chứng kiểu tương đồng cùng loài (ATV:RSV; 30mg/kg) được cho dùng theo kiểu trong tĩnh mạch đối với chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người ở thời điểm ngày 0. Để đo mức tăng sinh vi tế bào thần kinh đệm, các con chuột nhắt được cho dùng theo kiểu trong màng bụng bằng EdU ở thời điểm ngày 0, ngày 1, ngày 2 và ngày 3 sau khi điều trị kháng thể. Các con chuột nhắt được làm chết ở thời điểm ngày 1 và ngày 4 để phân tích. Phương pháp nhuộm kép EdU-Iba1 thể hiện mức tăng phụ thuộc vào liều dùng của vi tế bào thần kinh đệm mới sinh từ 1mg/kg đến 10mg/kg của các con vật được cho dùng theo liều lượng ATV:TREM2 ở thời điểm ngày 4, mà ATV:TREM2 10 mg/kg thể hiện tác dụng tối đa đối với mức tăng sinh vi tế bào thần kinh đệm (các Hình 17A và 17B). Hơn nữa, tác dụng của ATV:TREM2 1 mg/kg đối với mức tăng sinh vi tế bào thần kinh đệm là hơi cao hơn (không đáng kể về mặt thống kê) so với kháng thể kháng TREM2 hoặc kháng thể tham chiếu số 2, mặc cho việc cho dùng theo liều lượng cao hơn 30 lần.

ATV:TREM2 làm tăng một cách nhất thời các mức xytokin trong não ở chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người

Để xác định tác dụng của ATV:TREM2 đối với các mức xytokin (ví dụ, chemokin), các mức xytokin được đo trong các sản phẩm phân giải não và huyết tương cuối (được điều chế bằng dung dịch đệm phân giải Cell Signaling số 9803) của chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người bằng cách sử dụng Mouse Cytokine Array/Chemokine Array 44-Plex (MD44). Chúng tôi đã phát hiện ra rằng việc điều trị bằng ATV:TREM2 số 3 đã không thay đổi các mức xytokin được đo trong huyết tương, nhưng đã làm tăng một cách cấp tính một số mức xytokin (ví dụ, IP-10 và MCP-5) được đo trong não ở thời điểm 24 giờ sau liều lượng, và các mức xytokin này được phục hồi về mức đường cơ sở ở thời điểm 96 giờ sau liều lượng. ATV:TREM2 số 3 ở mức 3mg/kg đã có tác dụng tối đa đối với các mức xytokin trong não (các Hình 18A và 18B).

ATV:TREM2 làm tăng mức CSF1R trong não ở chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người

Để xác định tác dụng của ATV:TREM2 đối với mức của dấu ấn thần kinh đệm CSF1R, mức protein CSF1R được đo trong sản phẩm phân giải não (được điều chế bằng dung dịch đệm phân giải Cell Signaling số 9803) của chuột nhắt TB36/chèn thêm TfR của người bằng cách sử dụng kit ELISA thương mại (Abcam ab240681). Chúng tôi đã phát hiện ra rằng việc làm tăng liều lượng của ATV:TREM2 số 3 đã đem lại mức protein CSF1R tăng ở thời điểm 1 ngày sau khi điều trị và 4 ngày sau khi điều trị (Hình 19).

Profin PK huyết tương của ATV:TREM2

Đã quan sát thấy mức tăng theo tỷ lệ về PK huyết tương với liều lượng của ATV:TREM2 số 3 nằm trong khoảng từ 1mg/kg đến 100mg/kg. Ở thời điểm 24 giờ, các nồng độ trong huyết tương của các liều lượng trùng khớp của 30mg/kg của ATV:TREM2 số 3, kháng thể tham chiếu số 2, và Ab TREM2 là không khác nhau một cách đáng kể. Kháng thể tham chiếu số 2 dường như có mức thanh thải thấp hơn so với ATV:TREM2 số 3 và Ab TREM2 ở cùng một liều lượng (Hình 20).

Profin PK não của ATV:TREM2

Ở thời điểm 24 giờ, nồng độ trong não của 10mg/kg của ATV:TREM2 số 3 là tương tự với Ab TREM2 ở mức 30mg/kg, và nồng độ trong não của 1-3mg/kg của ATV:TREM2 số 3 là tương tự với kháng thể tham chiếu số 2 ở mức 30mg/kg. Đã quan sát thấy nhiều mức tăng theo tỷ lệ hơn ở liều lượng là 3mg/kg đến 10mg/kg của ATV:TREM2 số 3, và đã quan sát thấy mức tăng theo tỷ lệ ở các liều lượng khác. Ở thời điểm 96 giờ, nồng độ trong não của 10mg/kg của ATV:TREM2 số 3 là tương tự với Ab TREM2 và kháng thể tham chiếu số 2 ở mức 30mg/kg (Hình 21). Tổng thể, mức hấp thụ trong não của ATV:TREM2 số 3 thì có hiệu quả hơn Ab TREM2 và kháng thể tham chiếu số 2.

Bảng 8. Danh mục trình tự không chính thức

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
1	MEPLRLLILLFVTELSGAHNTTVFQGVAGQSLQVSCPYDS MKHWGRRKAWCRQLGEKGPCQRVVSTHNLWLLSFLRR WNGSTAITDDTLGGTLTITLRNLQPHDAGLYQCQSLHGSE ADTLRKVLVEVLADPLDHRDAGDLWFPGESESFEDAHVE HSISRSLLEGEIPFPPTSILLLLACIFLIKILAASALWAAAWH GQKPGTHPPSELDCGHDPGYQLQTLPGLRDT	Protein TREM2 của người
2	EVKLLDSGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWIRQP PGKAPEWLGVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNTQNI LYLQMNTLRAEDTAIYYCARLSYGFDYWGQGVMVTVSS	V_H của CL0020306
3	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCQSSKSLLHSNGKTYLNW YLQRPGQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKIS SVEAEDVGVYYCQQFLEFPFTFGSGTKLEIK	V_L của CL0020306
4	GFTFTDFYMS	CDR-H1 của CL0020306; CDR-H1 của CL0020164; CDR-H1 của CL0020188 và các biến thể CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, và CL0020188-8
5	VIRNKANGYTAGYNPSVKG	CDR-H2 của CL0020306; CDR-H2 của CL0020188 và các biến thể CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, và CL0020188-4
6	ARLSYGFDY	CDR-H3 của CL0020306

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
7	QSSKSLLHSNGKTYLN	CDR-L1 của CL0020306; CDR-L1 của CL0020164; CDR-L1 của CL0020307; CDR-L1 của CL0020307-1; CDR-L1 của CL0020188 và các biến thể CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-5, và CL0020188-6
8	WMSTRAS	CDR-L2 của CL0020306; CDR-L2 của CL0020307; CDR-L2 của CL0020307-1; CDR-L2 của CL0020164; CDR-L2 của CL0020188 và các biến thể CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, và CL0020188-8
9	QQFLEFPFT	CDR-L3 của CL0020306; CDR-L3 của CL0020307; CDR-L3 của CL0020307-1
10	EVKLLESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTNFYMSWIRQP PGRAPEWLGVIRNRPNGYTTDYNPSVKGRFTISRDNTQNI LYLQMSTLRADDTAFYYCTRLTYGFDYWGQGVMVTVSS	V_H của CL0020307

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
11	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCQSSKSLLHSNGKTYLNW YLQRPGQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKIS SVEAEVVGVYYCQQFLEFPFTFGSGTKLEIK	V_L của CL0020307
12	GFTFTNFYMS	CDR-H1 của CL0020307
13	VIRNRPNGYTTDYNPSVKG	CDR-H2 của CL0020307
14	TRLTYGFDY	CDR-H3 của CL0020307
15	EVKLLDSGGGLVQAGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWIRQP PGKAPEWLGVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNTQNI LYLQMNTLRAEDTAIYYCARLTYGFDYWGQGVMVTVSS	V_H của CL0020188
16	DIVMTQGALPNPVPSGESASITCQSSKSLLHSNGKTYLNW YLQRPGQSPQLLIYWMSTRASGVSDRFSGSGSGTDFTLKIS SVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGSGTKLEIK	V_L của CL0020188
17	ARLTYGFDY	CDR-H3 của CL0020188 và các biến thể CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, và CL0020188-8; CDR-H3 của CL0020164
18	QQFLEYPFT	CDR-L3 của CL0020188 và các biến thể CL0020188-1, CL0020188-2, CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, và CL0020188-8

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
19	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQAPGKGLEWVSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTVSS	V_H của CL0020188-1; V_H của CL0020188-3
20	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCQSSKSLLHSNGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQGTKVEIK	V_L của CL0020188-1; V_L của CL0020188-2; V_L của CL0020188-5; V_L của CL0020188-6
21	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWVRQAPGKGLEWVSVIRNKANGYTAGYNPSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTVSS	V_H của CL0020188-2; V_H của CL0020188-4
22	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCQSSKSLLHSTGKTYLNWYLQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQGTKVEIK	V_L của CL0020188-3; V_L của CL0020188-4; V_L của CL0020188-7; V_L của CL0020188-8
23	QSSKSLLHSTGKTYLN	CDR-L1 của các biến thể CL0020188-3, CL0020188-4, CL0020188-7, và CL0020188-8
24	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQAPGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTVSS	V_H của CL0020188-5; V_H của CL0020188-7
25	VIRNKANAYTAGYNPSVKG	CDR-H2 của các biến thể CL0020188-5, CL0020188-6, CL0020188-7, và CL0020188-8
26	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAGSGFTFTDFYMSWVRQAPGKGPEWLSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTVSS	V_H của CL0020188-6; V_H của CL0020188-8

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
27	DIVMTQSPDSLAVSLGERATINCQSSKSLLHSNGKTYLNW YQQKPGQPPKLLIYWMSTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLTIS SLQAEDVAVYYCQQFLEFPFTFGQGTKVEIK	V_L của CL0020307-1
28	G-F-T-F-T-α_6-F-Y-M-S, trong đó α_6 là D hoặc N	Trình tự liên ứng CDR-H1
29	V-I-R-N-β_5-β_6-N-β_8-Y-T-β_{11}-β_{12}-Y-N-P-S-V-K-G, trong đó β_5 là K hoặc R; β_6 là A hoặc P; β_8 là G hoặc A; β_{11} là A hoặc T; và β_{12} là G hoặc D	Trình tự liên ứng CDR-H2
30	γ_1-R-L-γ_4-Y-G-F-D-Y, trong đó γ_1 là A hoặc T; và γ_4 là T hoặc S	Trình tự liên ứng CDR-H3
31	Q-S-S-K-S-L-L-H-S-δ_{10}-G-K-T-Y-L-N, trong đó δ_{10} là N hoặc T	Trình tự liên ứng CDR-L1
32	Q-Q-F-L-E-ϕ_6-P-F-T, trong đó ϕ_6 là Y hoặc F	Trình tự liên ứng CDR-L3
33	000	
34	GGGGS	Trình tự gốc liên kết
35	HHHHHH	thẻ 6X-His
36	ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVS WNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCP	Miền hằng định chuỗi nặng 1 (CH1)
37	RTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQ WKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYE KHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Miền hằng định chuỗi nhẹ (CL)
38	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Trình tự Fc kiểu hoang của người các vị trí 231-447 theo cách đánh số bằng chỉ số Châu Âu
39	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL HEALHSHYTQKSLSLSPGK	Polypeptit Fc có các đột biến lỗ, LALA, và LS

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
40	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVWWESYGTE WSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSV MHEALHNHYTQKSLSLSPGK	Dòng 35.21
41	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWWESYGTE WSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSV LHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Polypeptit Fc Dòng CH3C.35.21 có các đột biến chốt, LALA, và LS
42	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPGK	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 / CH35.21 có các đột biến chốt, LALA và LS
43	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESFGTEW SNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Dòng CH3C.35.23.1.1

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
44	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGTEW SNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVL HEALHSHYTQKSLSLSPGK	Polypeptit Fc Dòng CH3C.35.23.1.1 có các đột biến chốt, LALA, và LS
45	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHY TQKSLSLSPGK	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 / CH35.23.1.1 có các đột biến chốt, LALA và LS
46	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEW VNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Dòng CH3C.35.23.3
47	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Polypeptit Fc CH3C.35.23.3 có các đột biến chốt, LALA, và LS

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
48	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPGK	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 / CH35.23.3 có các đột biến chốt, LALA và LS
49	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEW SNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVM HEALHNHYTQKSLSLSPGK	Dòng CH3C.35.23.4
50	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSV LHEALHSHYTQKSLSLSPGK	Polypeptit Fc CH3C.35.23.4 có các đột biến chốt, LALA, và LS

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
51	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPGK	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 / CH35.23.4 có các đột biến chốt, LALA và LS
52	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPGK	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 có các đột biến lỗ và LS

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
53	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPGK	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 có các đột biến lỗ, LALA và LS
54	DIVMTQTPLSLPVTPGEPASISCQSSKSLLHSTGKTYLNWY LQKPGQSPQLLIYWMSTRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISR VEAEDVGVYYCQQFLEYPFTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFI FPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQS GNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEV THQGLSSPVTKSFNRGEC	chuỗi nhẹ của kháng thể kháng TREM2
55	NSVIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHAN FGTKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAI GVLIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNH TQFPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKT DSTCRMVTSESKNVKLTVS	Miền đỉnh TfR của người
56	GGGGSGGGGS	Gốc liên kết
57	DKTHTCPPCP	Phần của trình tự bản lề IgG1 của người
58	YxTEWSS	Mô típ CH3 (Khả năng liên kết TfR)
59	TxxExxxxF	Mô típ CH3 (Khả năng liên kết TfR)

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
60	MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMK LGVDEEENTDNNTKANGTKPKRCGGNICYGTIAVIIFFLIG FMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPAREEPEEDFPAAP RLYWDDLKRKLSEKLDTTDFTSTIKLLNENLYVPREAGSQ KDENLALYIENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNS VIIVDKNGGLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFG TKKDFEDLDSPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGV LIYMDQTKFPIVKADLSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQ FPPSQSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDS TCKMVTSENKSVKLTVSNVLKETKILNIFGVIKGFVEPDH YVVVGAQRDAWGPGAAKSSVGTALLLKLAQMFSDMVL KDGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKA FTYINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQDVKHPVT GRSLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFC EDTDYPYLGTTMDTYKELVERIPELNKVARAAAEVAGQF VIKLTHDTELNLDYERYNSQLLLFLRDLNQYRADVKEMG LSLQWLYSARGDFFRATSRLTTDFRNAEKRDKFVMKKLN DRVMRVEYYFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLSALLES LKLRRQNNSAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVW DIDNEF	TfR của khỉ đuôi dài
61	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL HEALHSHYTQKSLSLSPGK	Polypeptit Fc có các đột biến lỗ và LS

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
62	MMDQARSAFSNLFGGEPLSYTRFSLARQVDGDNSHVEMK LAVDEEENADNNTKANVTKPKRCSGSICYGTIAVIVFFLIG FMIGYLGYCKGVEPKTECERLAGTESPVREEPGEDFPAAR RLYWDDLKRKLSEKLDSTDFTGTIKLLNENSYVPREAGSQ KDENLALYVENQFREFKLSKVWRDQHFVKIQVKDSAQNS VIIVDKNGRLVYLVENPGGYVAYSKAATVTGKLVHANFG TKKDFEDLYTPVNGSIVIVRAGKITFAEKVANAESLNAIGV LIYMDQTKFPIVNAELSFFGHAHLGTGDPYTPGFPSFNHTQ FPPSRSSGLPNIPVQTISRAAAEKLFGNMEGDCPSDWKTDS TCRMVTSESKNVKLTVSNVLKEIKILNIFGVIKGFVEPDHY VVVGAQRDAWGPGAAKSGVGTALLLKLAQMFSDMVLK DGFQPSRSIIFASWSAGDFGSVGATEWLEGYLSSLHLKAFT YINLDKAVLGTSNFKVSASPLLYTLIEKTMQNVKHPVTGQ FLYQDSNWASKVEKLTLDNAAFPFLAYSGIPAVSFCFCED TDYPYLGTTMDTYKELIERIPELNKVARAAAEVAGQFVIK LTHDVELNLDYERYNSQLLSFVRDLNQYRADIKEMGLSL QWLYSARGDFFRATSRLTTDFGNAEKTDRFVMKKLNDRV MRVEYHFLSPYVSPKESPFRHVFWGSGSHTLPALLENLKL RKQNNGAFNETLFRNQLALATWTIQGAANALSGDVWDID NEF	Protein thụ thể transferin 1 (TFR1) của người
63	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL HEALHSHYTQKSLSLSPG	Polypeptit Fc có các đột biến lỗ, LALA, và LS, được cắt cụt
64	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWWESYGTE WSSYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSV LHEALHSHYTQKSLSLSPG	Polypeptit Fc Dòng CH3C.35.21 có các đột biến chốt, LALA, và LS, được cắt cụt

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
65	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPG	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 / CH35.21 có các đột biến chốt, LALA và LS, được cắt cụt
66	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGTEW SNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVL HEALHSHYTQKSLSLSPG	Polypeptit Fc Dòng CH3C.35.23.1.1 có các đột biến chốt, LALA, và LS, được cắt cụt
67	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESFGTEWSNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSHY TQKSLSLSPG	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 / CH35.23.1.1 có các đột biến chốt, LALA và LS, được cắt cụt

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
68	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WVNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCS VLHEALHSHYTQKSLSLSPG	Polypeptit Fc CH3C.35.23.3 có các đột biến chốt, LALA, và LS, được cắt cụt
69	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPG	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 / CH35.23.3 có các đột biến chốt, LALA và LS, được cắt cụt
70	APEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTE WSNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSV LHEALHSHYTQKSLSLSPG	Polypeptit Fc CH3C.35.23.4 có các đột biến chốt, LALA, và LS, được cắt cụt

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
71	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWSNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVSKEEWQQGFVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPG	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 / CH35.23.4 có các đột biến chốt, LALA và LS, được cắt cụt
72	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPG	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 có các đột biến lỗ và LS, được cắt cụt

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
73	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVLHEALHSH YTQKSLSLSPG	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 có các đột biến lỗ, LALA và LS, được cắt cụt
74	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSQWMNWVR QAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTITADTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLLRNQPGESYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHE ALHNHYTQKSLSLSPGK	Chuỗi nặng của kháng thể tham chiếu số 1
75	DVVMTQSPDSLAVSLGERATINCRSSQSLVHSNRYTYLH WYQQKPGQSPKLLIYKVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKI SRVEAEDVGVYYCSQSTRVPYTFGQGTKLEIKRTVAAPSV FIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQ SGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACE VTHQGLSSPVTKSFNRGEC	Chuỗi nhẹ của kháng thể tham chiếu số 1 và số 2

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
76	QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYAFSSQWMNWVR QAPGQRLEWIGRIYPGGGDTNYAGKFQGRVTITADTSAST AYMELSSLRSEDTAVYYCARLLRNQPGESYAMDYWGQG TLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFP EPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSS LGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAP ELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEV KFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQ DWLNGKEYKCKVSNKALPASIEKTISKAKGQPREPQVYTL PPSRDELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNY KTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHG ALHNHYTQKSLSLSPGK	Chuỗi nặng của kháng thể tham chiếu số 2
77	QVQLQESGPGLVKPSETLSLTCAVSGYSITSDYAWNWIRQ PPGKGLEWIGYMSYSGSTRYNPSLRSRVTISVDTSKNQFSL KLSSVTAADTAVYYCARGWPLAYWGQGTLVTVSSASTK GPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSG ALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNV NHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFL FPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDG VEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEY KCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRDELTK NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDS DGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQ KSLSLSPGK	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của các kháng thể tham chiếu số 1 và số 2, chuỗi nặng
78	EIVMTQSPATLSLSPGERATLSCSASSSVSYMYWYQQKPG QAPRLLIYDTSNLASGIPARFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDF AVYYCQQWSSYPPITFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của các kháng thể tham chiếu số 1 và số 2, chuỗi nhẹ

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
79	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQ PPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQV VLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWYFDVWGAGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVWWESYGTEWSSYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của ATV:TREM2 số 1, chuỗi nặng có chốt, LALA
80	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQ PPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQV VLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWYFDVWGAGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESYGTEWVNYKTTP PVLDSDGSFFLYSKLTVTKEEWQQGFVFSCSVMHEALHN HYTQKSLSLSPGK	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của ATV:TREM2 số 3, chuỗi nặng có chốt, LALA

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
81	QVTLRESGPALVKPTQTLTLTCTFSGFSLSTSGMSVGWIRQ PPGKALEWLADIWWDDKKDYNPSLKSRLTISKDTSKNQV VLKVTNMEPADTATYYCARSMITNWYFDVWGAGTTVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của ATV:TREM số 1 và số 3, chuỗi nặng có lỗ, LALA
82	DIQMTQSPSTLSASVGDRVTITCKCQLSVGYMHWYQQKP GKAPKLLIYDTSKLASGVPSRFSGSGSGTEFTLTISSLQPDD FATYYCFQGSGYPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDE QLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQES VTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLS SPVTKSFNRGEC	Đối chứng kiểu tương đồng cùng loài của ATV:TREM2 số 1 và số 3, chuỗi nhẹ
83	EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFTDFYMSWVRQ APGKGLEWVSVIRNKANAYTAGYNPSVKGRFTISRDNSK NTLYLQMNSLRAEDTAVYYCARLTYGFDYWGQGTLVTV SSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTV SWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQT YICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGG PSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNW YVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLN GKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSRD ELTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPP VLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNH YTQKSLSLSPGK	chuỗi nặng của kháng thể kháng TREM2 có các đột biến LALA

SEQ ID NO	Trình tự	Mô tả
84	APELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDP EVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL HQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQV YTLPPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESNGQPE NNYKTTPPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVL HEALHSHYTQKSLSLSPG	Polypeptit Fc có các đột biến lỗ và LS, được cắt cụt

Tham chiếu chéo các đơn liên quan

Đơn đăng ký này yêu cầu hưởng quyền ưu tiên đối với Đơn đăng ký Bằng sáng chế Tạm thời tại Hoa Kỳ số 62/960,663, được nộp ngày 13 tháng 1 năm 2020, Đơn đăng ký Bằng sáng chế Tạm thời tại Hoa Kỳ số 63/070,728, được nộp ngày 26 tháng 8 năm 2020, và Đơn đăng ký Bằng sáng chế Tạm thời tại Hoa Kỳ số 63/091,717, được nộp ngày 14 tháng 10 năm 2020, thông tin bộc lộ của tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn vì tất cả các mục đích.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm:

(a) vùng biến đổi bao gồm:

i. trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự của G-F-T-F-T-α_6-F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), trong đó α_6 là D hoặc N;

ii. trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự của V-I-R-N-β_5-β_6-N-β_8-Y-T-β_{11}-β_{12}-Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), trong đó β_5 là K hoặc R; β_6 là A hoặc P; β_8 là G hoặc A; β_{11} là A hoặc T; và β_{12} là G hoặc D;

iii. trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự của γ_1-R-L-γ_4-Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), trong đó γ_1 là A hoặc T; và γ_4 là T hoặc S;

iv. trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự của Q-S-S-K-S-L-L-H-S-δ_{10}-G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), trong đó δ_{10} là N hoặc T;

v. trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự WMSTRAS (SEQ ID NO:8); và

vi. trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự của Q-Q-F-L-E-ϕ_6-P-F-T (SEQ ID NO:32), trong đó ϕ_6 là Y hoặc F;

(b) polypeptit Fc thứ nhất liên kết một cách đặc hiệu vào thụ thể transferin 1 ở người và bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO:49; và

(c) polypeptit Fc thứ hai.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó:

(a) trình tự CDR-H1 được chọn lựa từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:4 và 12;

(b) trình tự CDR-H2 được chọn lựa từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:5, 13 và 25;

(c) trình tự CDR-H3 được chọn lựa từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:6, 14, và 17;

(d) trình tự CDR-L1 được chọn lựa từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:7 và 23;

(e) trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự WMSTRAS (SEQ ID NO:8); và

(f) trình tự CDR-L3 được chọn lựa từ nhóm bao gồm các SEQ ID NO:9 và 18.

3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó vùng biến đổi này bao gồm CDR-H1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:4, CDR-H2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:25, CDR-H3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:17, CDR-L1 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:23, CDR-L2 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:8, và CDR-L3 bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:18.

4. Kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó vùng biến đổi này bao gồm trình tự VH mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO: 24, và trình tự VL mà có độ đồng nhất trình tự ít nhất 85% với SEQ ID NO: 22.

5. Kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó polypeptit Fc thứ nhất bao gồm: Trp, Leu, hoặc Glu ở vị trí 380; Tyr hoặc Phe ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí 388; Ser, Ala, hoặc Val ở vị trí 389; Ser hoặc Asn ở vị trí 390; Thr hoặc Ser ở vị trí 413; Glu hoặc Ser ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số Châu Âu.

6. Kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó:

(a) polypeptit Fc thứ nhất có dạng thay thế T366W và polypeptit Fc thứ hai có các dạng thay thế T366S, L368A, và Y407V, theo cách đánh số châu Âu;

(b) polypeptit Fc thứ nhất và/hoặc polypeptit Fc thứ hai bao gồm các dạng thay thế axit amin của Ala ở vị trí 234 và Ala ở vị trí 235, theo cách đánh số châu Âu; và/hoặc

(c) polypeptit Fc thứ nhất và/hoặc polypeptit Fc thứ hai bao gồm các dạng thay thế axit amin của Leu ở vị trí 428 và Ser ở vị trí 434, theo cách đánh số châu Âu.

7. Kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:41 hoặc SEQ ID NO:64, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:63.

8. Kháng thể theo điểm 7, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:41 hoặc 64;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39 hoặc 63; và

(iii) hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID

NO:22.

9. Kháng thể theo điểm 8, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:42 hoặc 65;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53 hoặc 73; và

(iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

10. Kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:44 hoặc SEQ ID NO:66, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:63.

11. Kháng thể theo điểm 10, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:44 hoặc 66;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39 hoặc 63; và

(iii) hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22.

12. Kháng thể theo điểm 11, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:45 hoặc 67;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53 hoặc 73; và

(iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

13. Kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:47 hoặc SEQ ID NO:68, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:63.

14. Kháng thể theo điểm 13, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:47 hoặc 68;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và

polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39 hoặc 63; và

(iii) hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22.

15. Kháng thể theo điểm 14, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:48 hoặc 69;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53 hoặc 73; và

(iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

16. Kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:47 hoặc SEQ ID NO:68, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:61 hoặc SEQ ID NO:84.

17. Kháng thể theo điểm 16, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:47 hoặc 68;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:61 hoặc 84; và

(iii) hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22.

18. Kháng thể theo điểm 17, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:48 hoặc 69;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:52 hoặc 72; và

(iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

19. Kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó polypeptit Fc thứ nhất bao gồm trình tự của SEQ ID NO:50 hoặc SEQ ID NO:70, và polypeptit Fc thứ hai bao gồm trình tự của SEQ ID NO:39 hoặc SEQ ID NO:63.

20. Kháng thể theo điểm 19, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và

polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:50 hoặc 70;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39 hoặc 63; và

(iii) hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22.

21. Kháng thể theo điểm 20, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:51 hoặc 71;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai mà bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53 hoặc 73; và

(iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm hoặc gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

22. Kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:47;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:39; và

(iii) hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22.

23. Kháng thể theo điểm 22, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất mà gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:48;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai mà gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:53; và

(iii) chuỗi nhẹ (LC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nhẹ này gồm trình tự axit amin được nêu ra ở SEQ ID NO:54.

24. Kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ nhất bao gồm SEQ ID NO:68;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai bao gồm V_H bao gồm SEQ ID NO:24 và polypeptit Fc thứ hai bao gồm SEQ ID NO:63; và

(iii) hai chuỗi nhẹ, mỗi chuỗi nhẹ này bao gồm V_L bao gồm SEQ ID NO:22.

25. Kháng thể theo điểm 24, bao gồm:

(i) chuỗi nặng (HC) thứ nhất mà gồm trình tự axit amin nêu ra ở SEQ ID NO:69;

(ii) chuỗi nặng (HC) thứ hai mà gồm trình tự axit amin nêu ra ở SEQ ID NO:73; và

(iii) chuỗi nặng (HC) thứ nhất và thứ hai mà mỗi chuỗi nặng này gồm trình tự axit amin nêu ra ở SEQ ID NO:54.

26. Dược phẩm chứa kháng thể được phân lập theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25 và chất mang dược dụng.

27. Polynucleotit được phân lập bao gồm:

(a) trình tự nucleotit mã hóa kháng thể theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 25; hoặc

(b) trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:42, 53, và 54; hoặc

(c) trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:45, 53, và 54; hoặc

(d) trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:48, 53, và 54; hoặc

(e) trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:48, 52, và 54; hoặc

(f) trình tự nucleotit mã hóa các SEQ ID NO:51, 53, và 54.

28. Vectơ hoặc tế bào chủ bao gồm polynucleotit theo điểm 27.

29. Phương pháp biểu hiện kháng thể mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), bao gồm bước: nuôi cấy tế bào chủ theo điểm 28 trong các điều kiện thích hợp cho quá trình biểu hiện kháng thể này.

30. Kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2), trong đó kháng thể này bao gồm:

(a) vùng biến đổi bao gồm:

i. trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự của G-F-T-F-T-α_6-F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), trong đó α_6 là D hoặc N;

ii. trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự của V-I-R-N-β_5-β_6-N-β_8-Y-T-β_{11}-β_{12}-Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), trong đó β_5 là K hoặc R; β_6 là A

hoặc P; β_8 là G hoặc A; β_{11} là A hoặc T; và β_{12} là G hoặc D;

iii. trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự của γ_1-R-L-γ_4-Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), trong đó γ_1 là A hoặc T; và γ_4 là T hoặc S;

iv. trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự của Q-S-S-K-S-L-L-H-S-δ_{10}-G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), trong đó δ_{10} là N hoặc T;

v. trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự WMSTRAS (SEQ ID NO:8); và

vi. trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự của Q-Q-F-L-E-ϕ_6-P-F-T (SEQ ID NO:32), trong đó ϕ_6 là Y hoặc F;

(b) polypeptit Fc thứ nhất liên kết một cách đặc hiệu vào thụ thể transferin 1 ở người và bao gồm: Trp, Leu, hoặc Glu ở vị trí 380; Tyr hoặc Phe ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí 388; Ser, Ala, hoặc Val ở vị trí 389; Ser hoặc Asn ở vị trí 390; Thr hoặc Ser ở vị trí 413; Glu hoặc Ser ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số châu Âu; và

(c) polypeptit Fc thứ hai.

31. Kháng thể theo điểm 30, trong đó:

(a) polypeptit Fc thứ nhất có dạng thay thế T366W và polypepti Fc thứ hai có các dạng thay thế T366S, L368A, và Y407V, theo cách đánh số châu Âu;

(b) polypeptit Fc thứ nhất và/hoặc polypepti Fc thứ hai bao gồm các dạng thay thế axit amin của Ala ở vị trí 234 và Ala ở vị trí 235, theo cách đánh số châu Âu; và/hoặc

(c) polypeptit Fc thứ nhất và/hoặc polypepti Fc thứ hai bao gồm các dạng thay thế axit amin của Leu ở vị trí 428 và Ser ở vị trí 434, theo cách đánh số châu Âu.

32. Kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2) để sử dụng trong điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, làm giảm mức sTREM2, hoặc tăng cường hoạt tính TREM2, trong đó kháng thể này bao gồm:

(a) vùng biến đổi bao gồm:

i. trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự của G-F-T-F-T-α_6-F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), trong đó α_6 là D hoặc N;

ii. trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự của V-I-R-N-β_5-β_6-N-β_8-Y-T-

β_{11}-β_{12}-Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), trong đó β_5 là K hoặc R; β_6 là A hoặc P; β_8 là G hoặc A; β_{11} là A hoặc T; và β_{12} là G hoặc D;

iii. trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự của γ_1-R-L-γ_4-Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), trong đó γ_1 là A hoặc T; và γ_4 là T hoặc S;

iv. trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự của Q-S-S-K-S-L-L-H-S-δ_{10}-G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), trong đó δ_{10} là N hoặc T;

v. trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự WMSTRAS (SEQ ID NO:8); và

vi. trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự của Q-Q-F-L-E-ϕ_6-P-F-T (SEQ ID NO:32), trong đó ϕ_6 là Y hoặc F;

(b) polypeptit Fc thứ nhất liên kết một cách đặc hiệu vào thụ thể transferin 1 ở người và bao gồm trình tự có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% với SEQ ID NO:49; và

(c) polypeptit Fc thứ hai.

33. Kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với thụ thể khởi động của người được biểu hiện trên các tế bào tủy xương 2 (TREM2) để sử dụng trong điều trị bệnh thoái hóa thần kinh, làm giảm mức sTREM2, hoặc tăng cường hoạt tính TREM2, trong đó kháng thể này bao gồm:

(a) vùng biến đổi bao gồm:

i. trình tự CDR-H1 bao gồm trình tự của G-F-T-F-T-α_6-F-Y-M-S (SEQ ID NO:28), trong đó α_6 là D hoặc N;

ii. trình tự CDR-H2 bao gồm trình tự của V-I-R-N-β_5-β_6-N-β_8-Y-T-β_{11}-β_{12}-Y-N-P-S-V-K-G (SEQ ID NO:29), trong đó β_5 là K hoặc R; β_6 là A hoặc P; β_8 là G hoặc A; β_{11} là A hoặc T; và β_{12} là G hoặc D;

iii. trình tự CDR-H3 bao gồm trình tự của γ_1-R-L-γ_4-Y-G-F-D-Y (SEQ ID NO:30), trong đó γ_1 là A hoặc T; và γ_4 là T hoặc S;

iv. trình tự CDR-L1 bao gồm trình tự của Q-S-S-K-S-L-L-H-S-δ_{10}-G-K-T-Y-L-N (SEQ ID NO:31), trong đó δ_{10} là N hoặc T;

v. trình tự CDR-L2 bao gồm trình tự WMSTRAS (SEQ ID NO:8); và

vi. trình tự CDR-L3 bao gồm trình tự của Q-Q-F-L-E-ϕ_6-P-F-T (SEQ ID NO:32), trong đó ϕ_6 là Y hoặc F;

(b) polypeptit Fc thứ nhất liên kết một cách đặc hiệu vào thụ thể transferin 1 ở người và bao gồm: Trp, Leu, hoặc Glu ở vị trí 380; Tyr hoặc Phe ở vị trí 384; Thr ở vị trí 386; Glu ở vị trí 387; Trp ở vị trí 388; Ser, Ala, hoặc Val ở vị trí 389; Ser hoặc Asn ở vị trí 390; Thr hoặc Ser ở vị trí 413; Glu hoặc Ser ở vị trí 415; Glu ở vị trí 416; và Phe ở vị trí 421, theo cách đánh số châu Âu; và

(c) polypeptit Fc thứ hai.

Hình 1A

Hình 1B

Hình 1C

Hình 1D

Hình 1E

CL0020188-5

Hình 1F

CL0020188-6

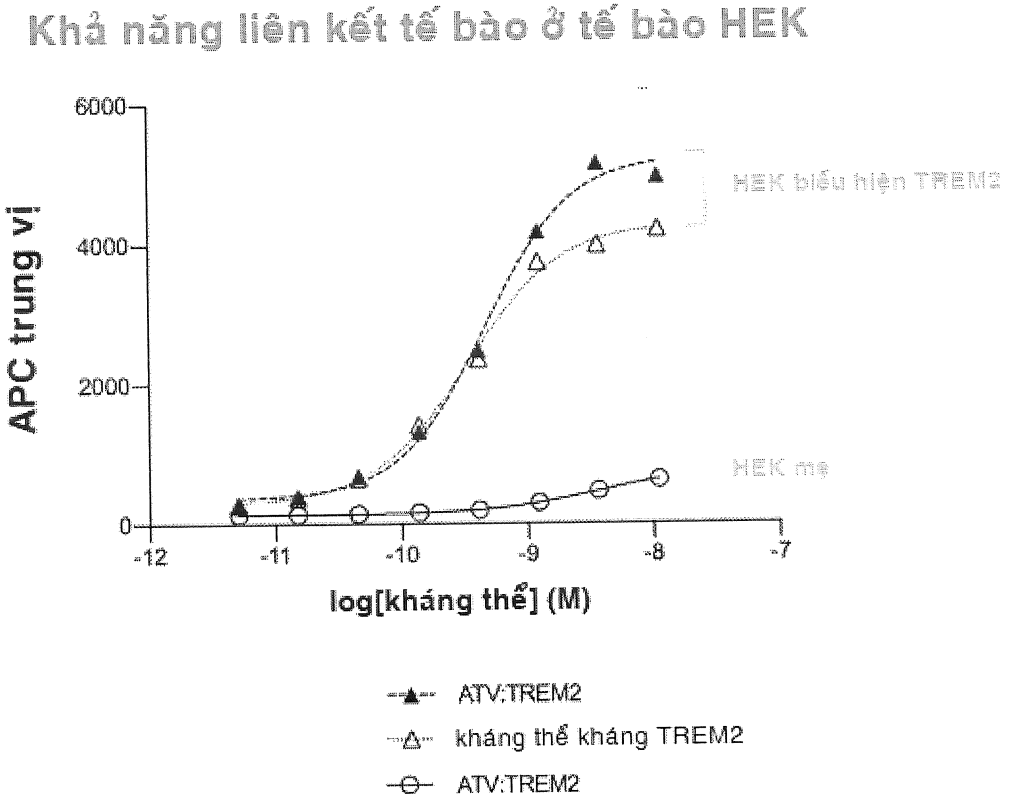
Hình 1G

CL0020188-7

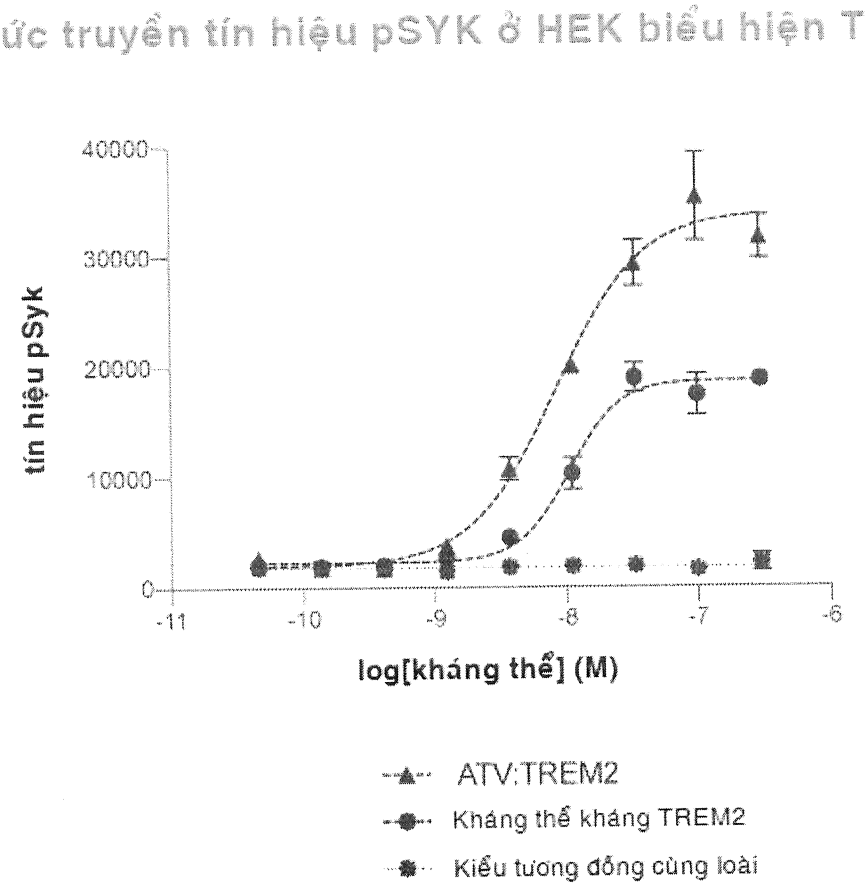
Hình 1H

CL0020188-8

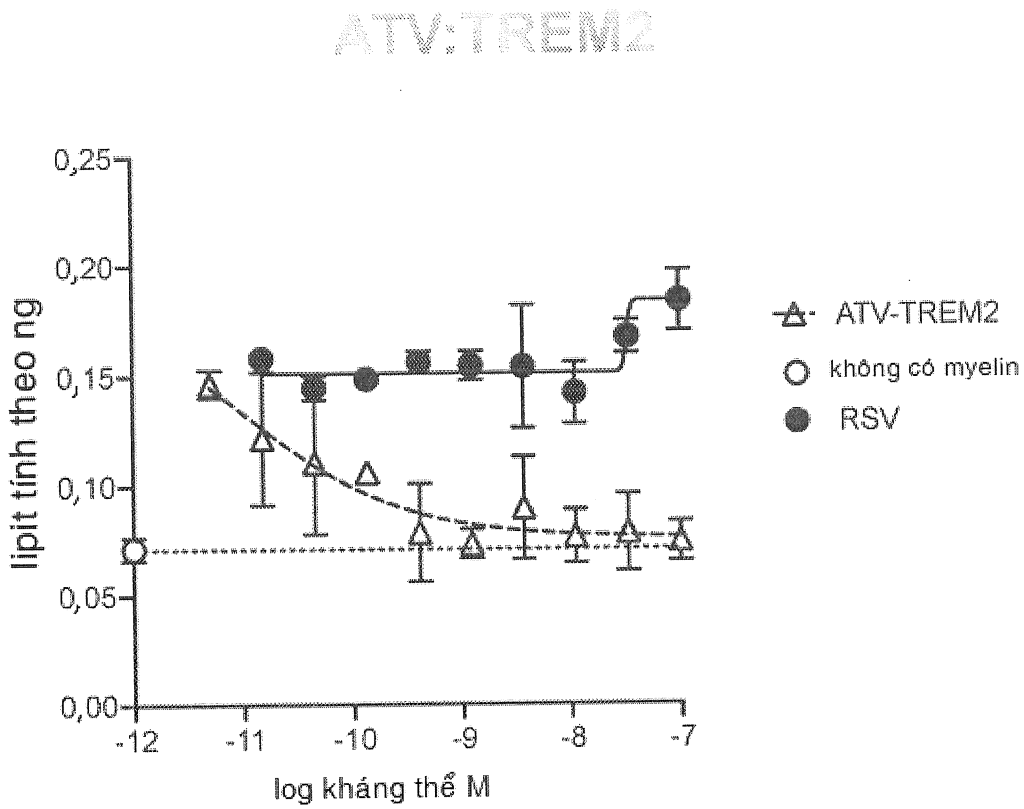
Hình 2


Khả năng liên kết tế bào ở tế bào HEK
APC trung vị
6000
4000
2000
0
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log[kháng thể] (M)
HEK biểu hiện TREM2
HEK mẹ
ATV:TREM2
kháng thể kháng TREM2
ATV:TREM2

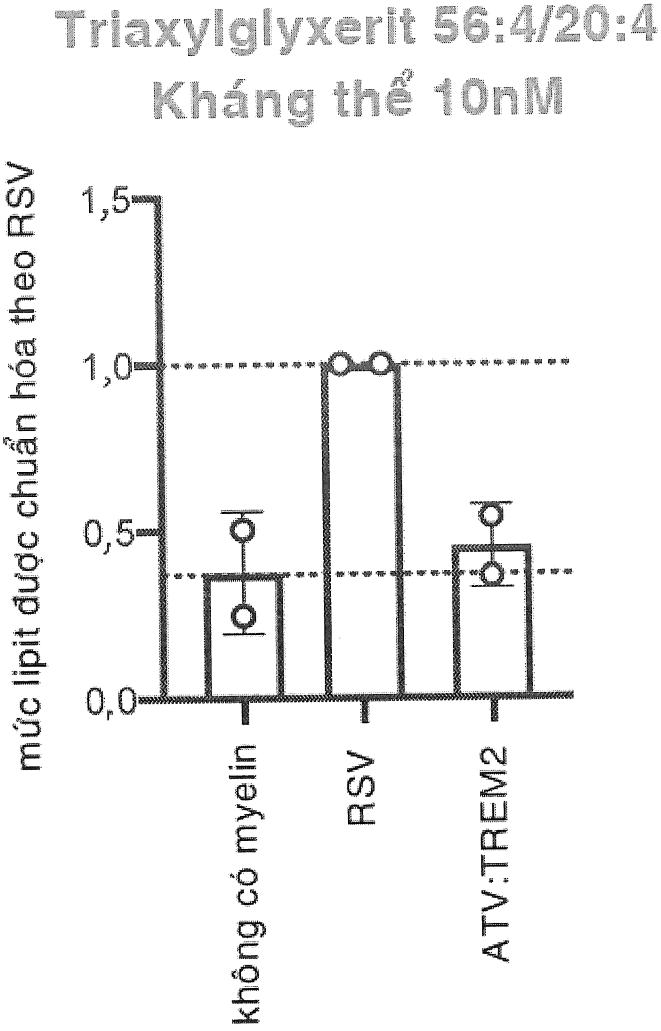
Hình 3


Mức truyền tín hiệu pSYK ở HEK biểu hiện TREM2
tín hiệu pSyk
40000
30000
20000
10000
0
-11
-10
-9
-8
-7
-6
log[kháng thể] (M)
ATV:TREM2
Kháng thể kháng TREM2
Kiểu tương đồng cùng loài

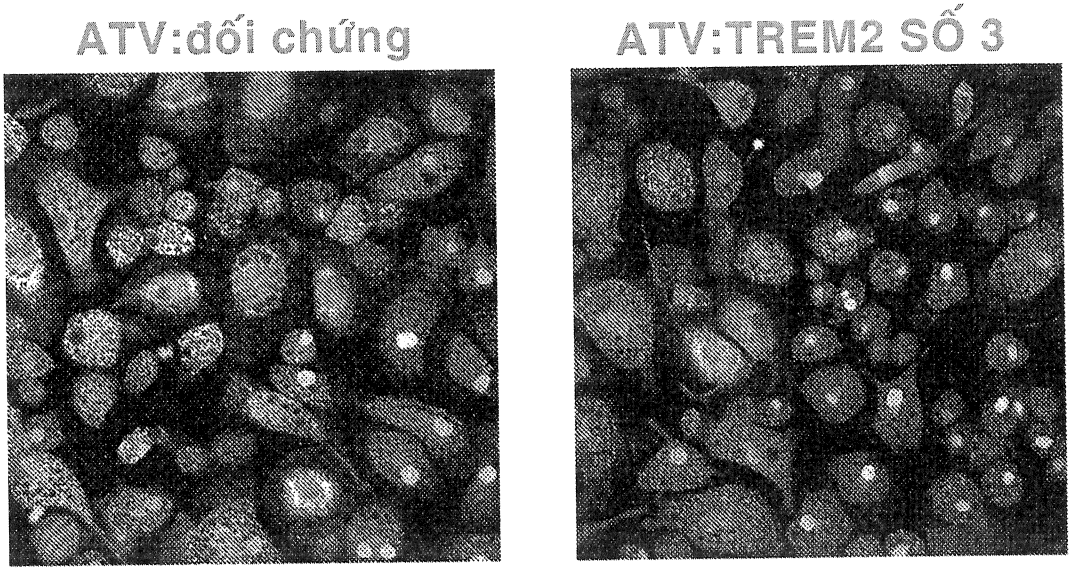
Hình 4A


ATV:TREM2
0,25
0,20
0,15
0,10
0,05
0,00
lipit tính theo ng
-12
-11
-10
-9
-8
-7
log kháng thể M
ATV-TREM2
không có myelin
RSV

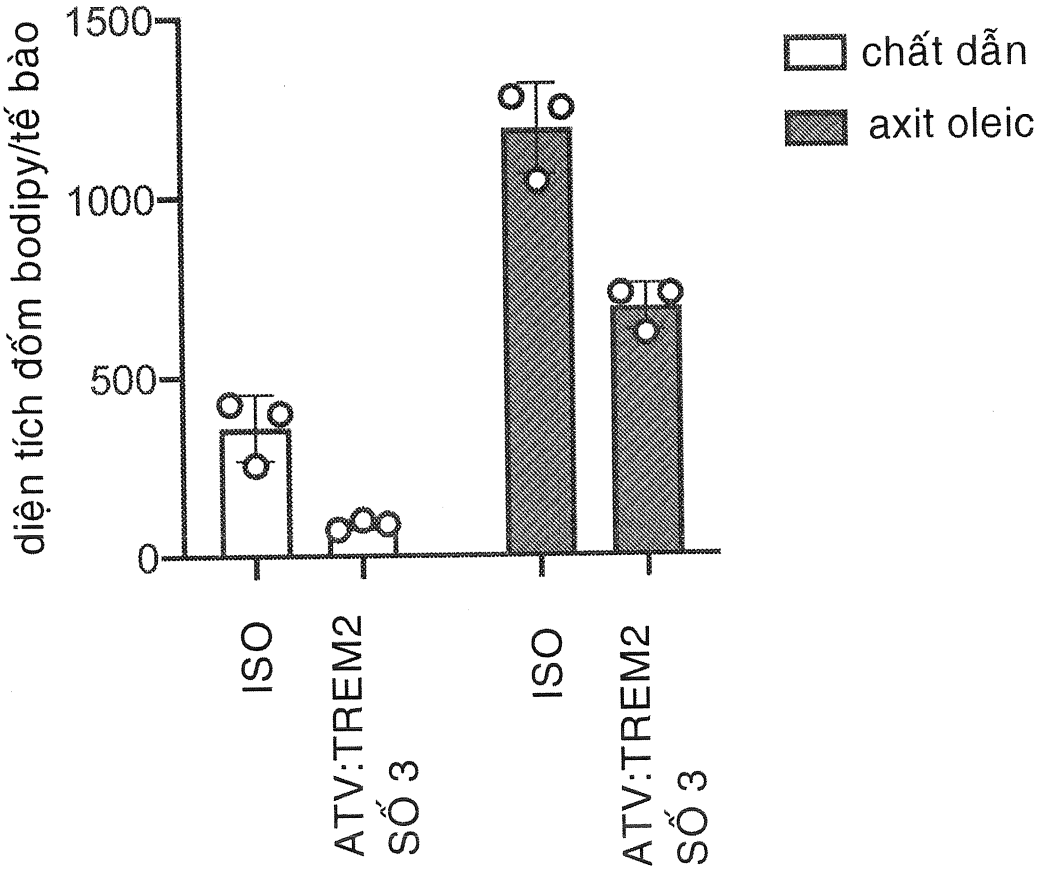
Hình 4B


Triaxylglyxerit 56:4/20:4
Kháng thể 10nM
mức lipit được chuẩn hóa theo RSV
1,5
1,0
0,5
0,0
không có myelin
RSV
ATV:TREM2

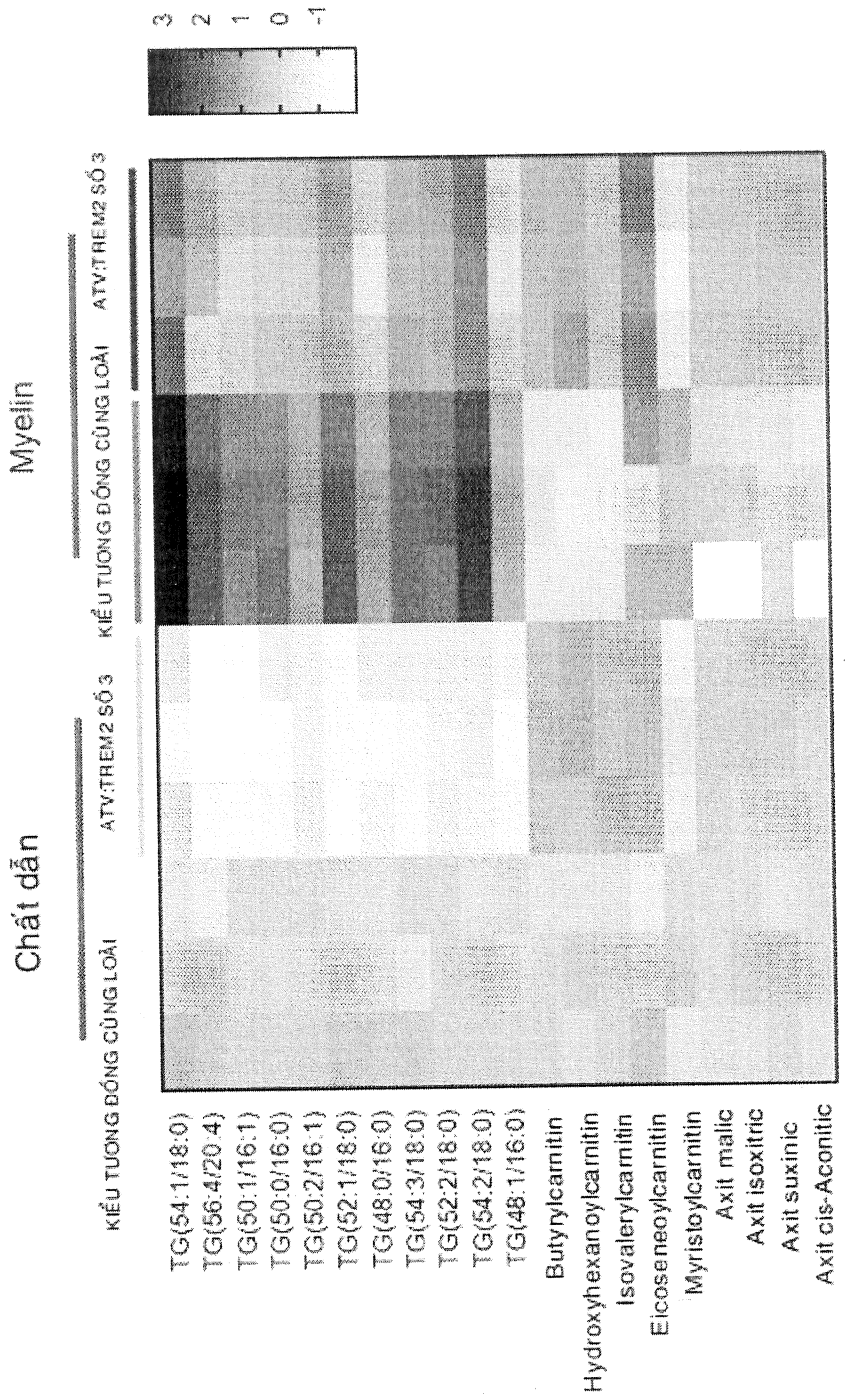
Hình 5A



Hình 5B

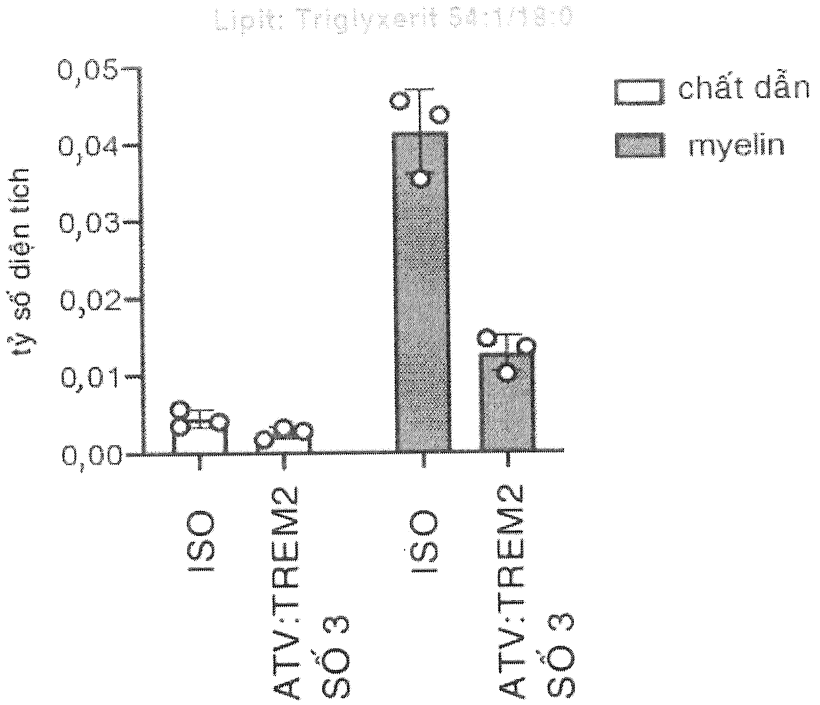


Hình 5C

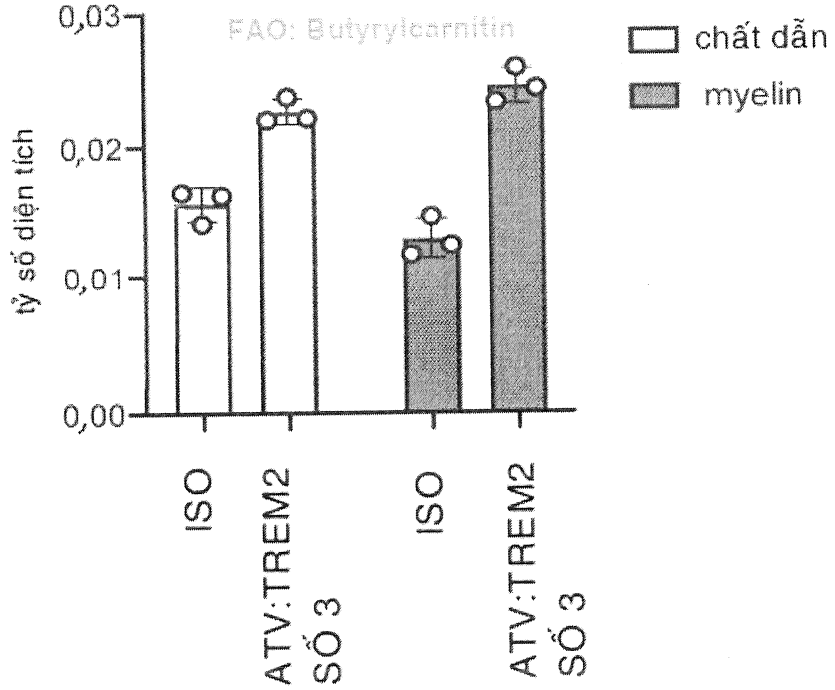


Bản đồ nhiệt thể hiện tất cả các loại trong số > 200 được đo có mức thay đổi gấp số lần > 1,5 và p < 0,05

Hình 5D

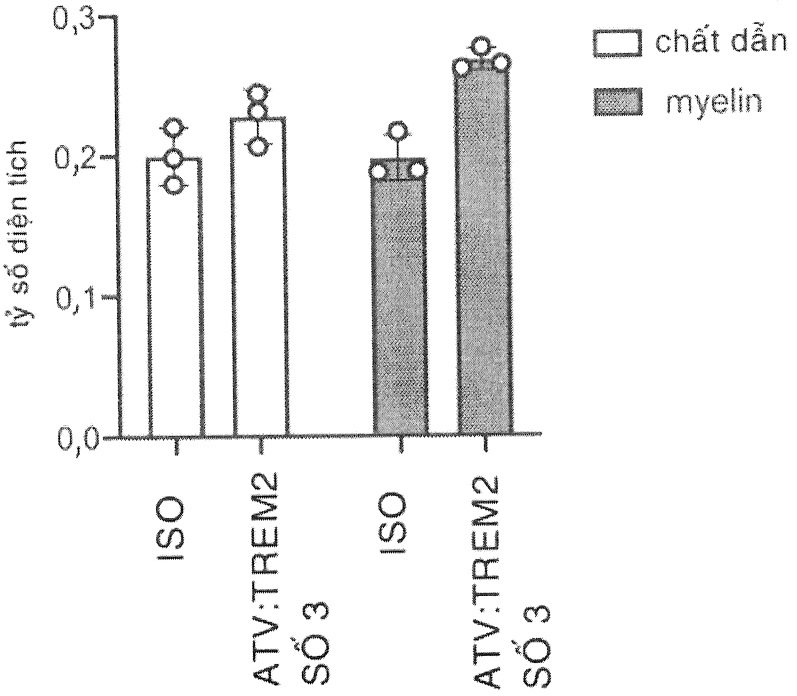


Hình 5E

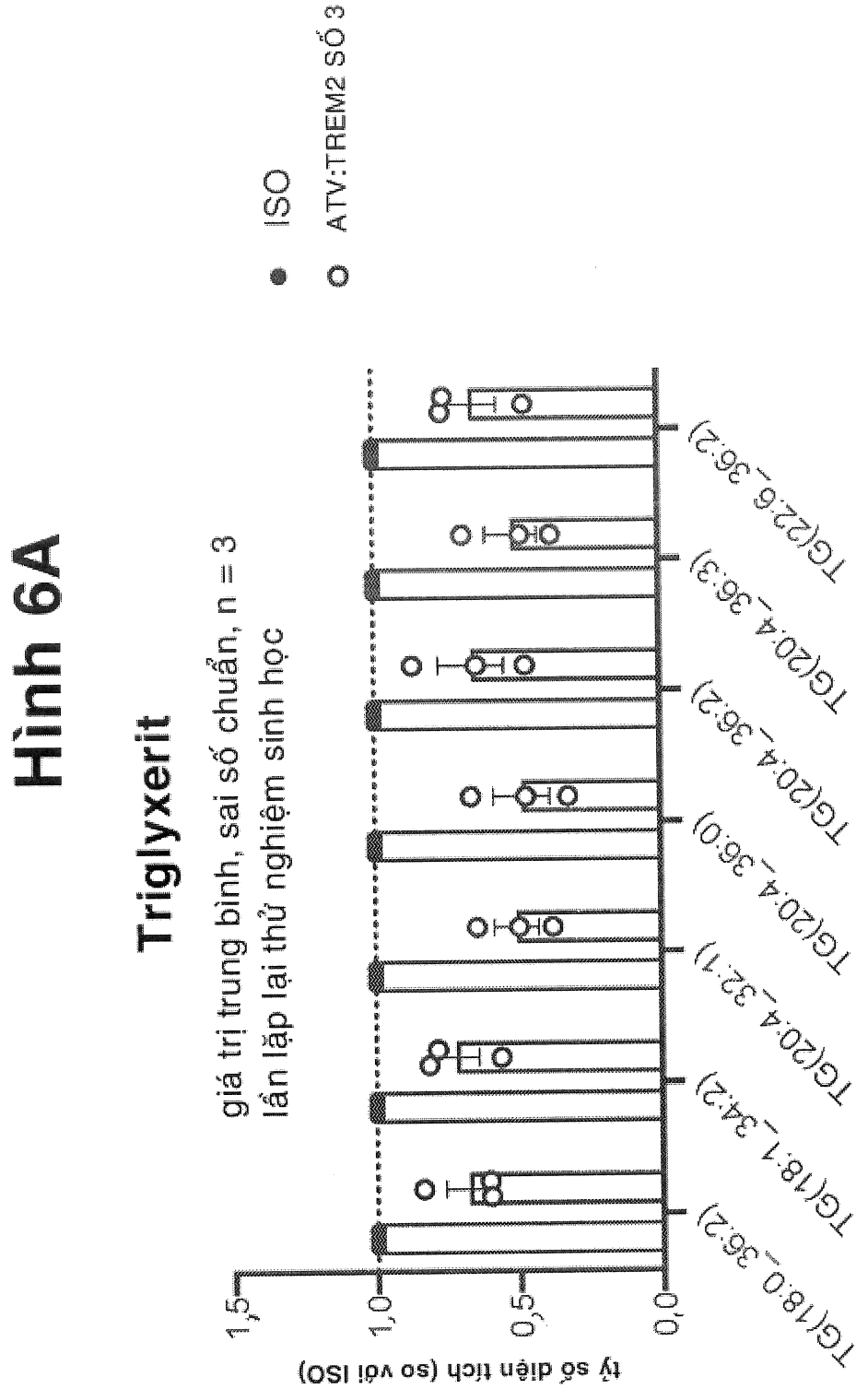


Hình 5F

Chu trình TCA: Suxinat



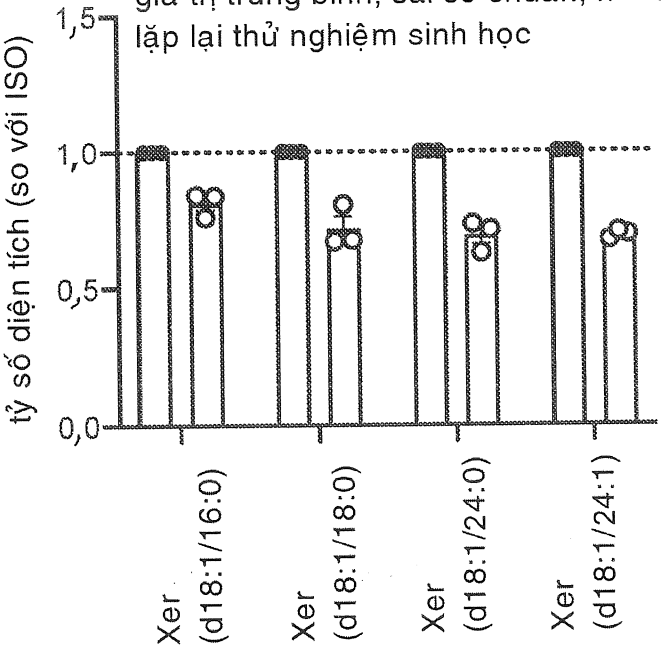
Hình 6A


Triglyxerit
giá trị trung bình, sai số chuẩn, n = 3
lần lặp lại thử nghiệm sinh học
ISO
ATV:TREM2 SỐ 3
tỷ số diện tích (so với ISO)
1,5
1,0
0,5
0,0
TG(18:0_36:2)
TG(18:1_34:2)
TG(20:4_32:1)
TG(20:4_36:0)
TG(20:4_36:2)
TG(20:4_36:3)
TG(22:6_36:2)

Hình 6B

Các xeramit

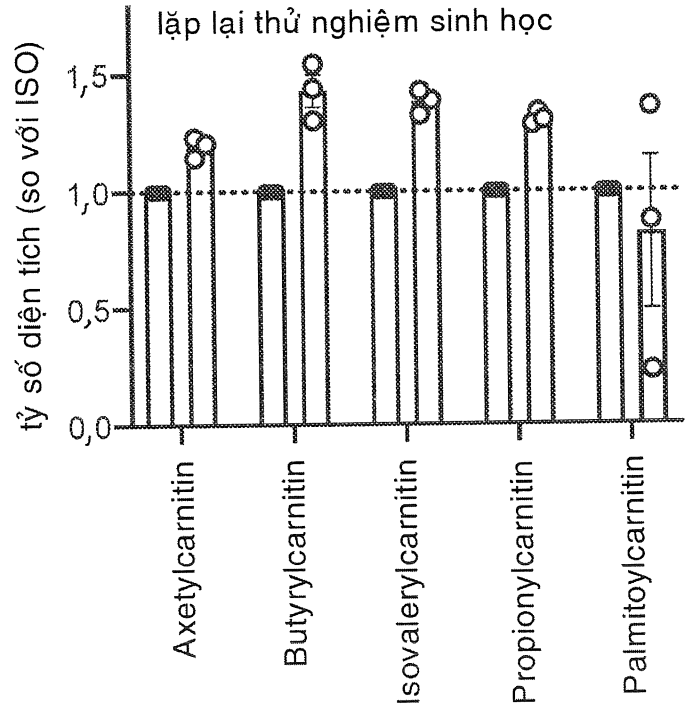
giá trị trung bình, sai số chuẩn, n = 3 lần lặp lại thử nghiệm sinh học



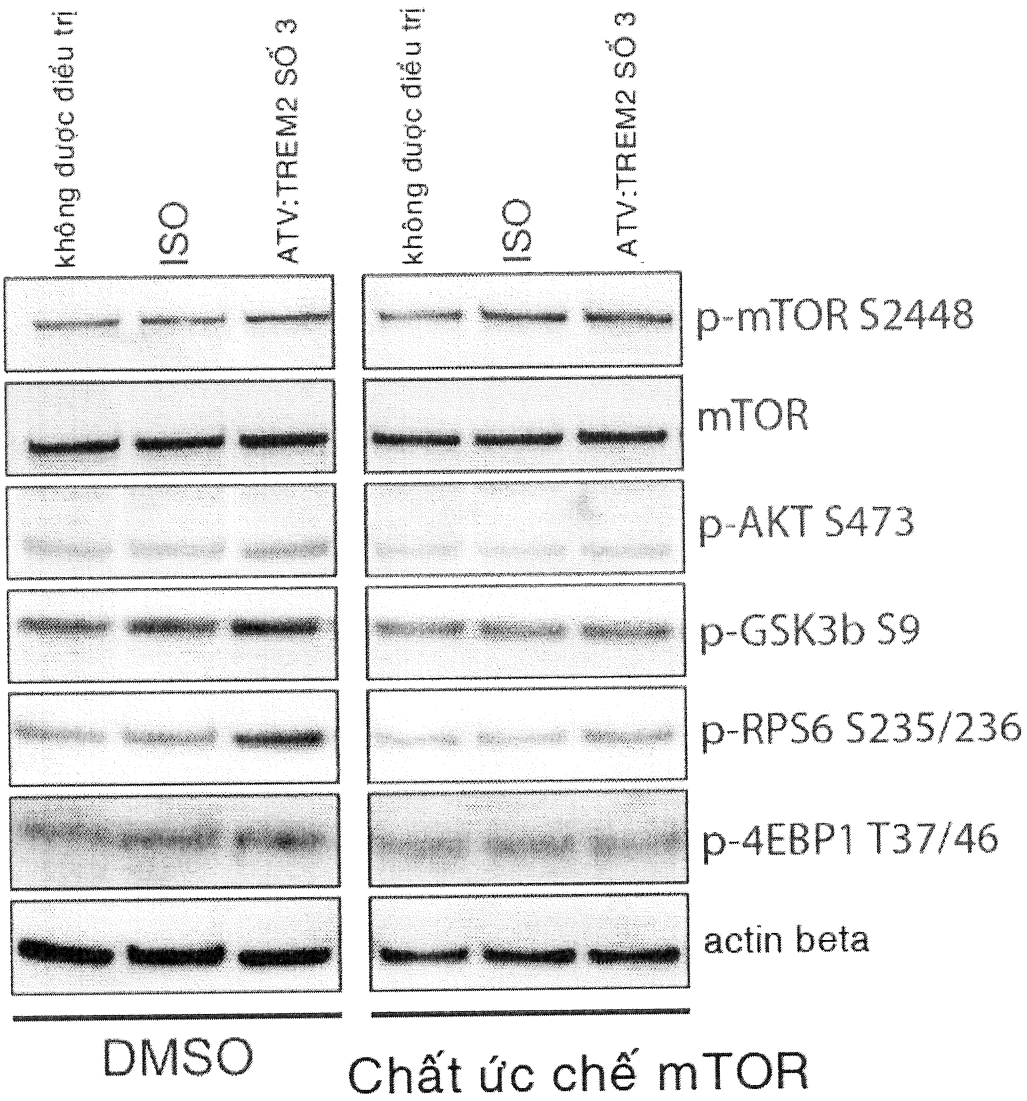
Hình 6C

Các axyl carnitin

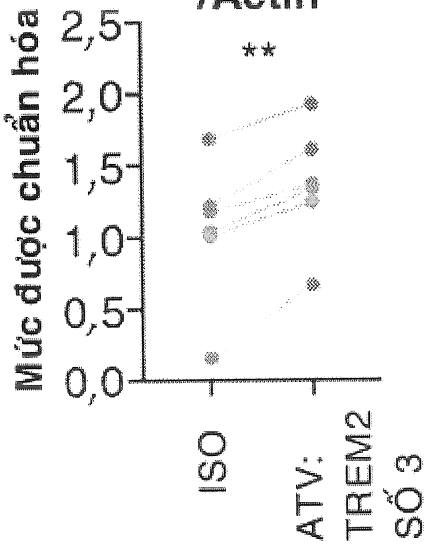
giá trị trung bình, sai số chuẩn, n = 3 lần lặp lại thử nghiệm sinh học



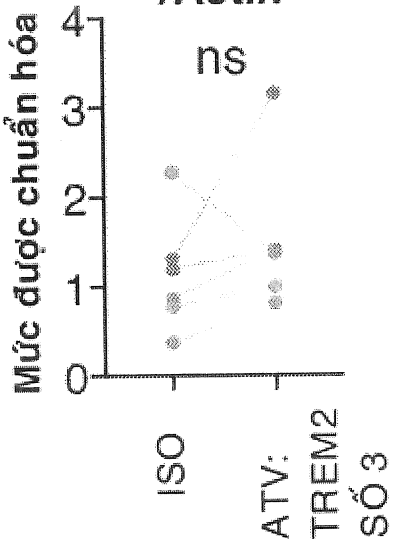
Hình 7A


không được điều trị
ISO
ATV:TREM2 SỐ 3
không được điều trị
ISO
ATV:TREM2 SỐ 3
p-mTOR S2448
mTOR
p-AKT S473
p-GSK3b S9
p-RPS6 S235/236
p-4EBP1 T37/46
actin beta
DMSO
Chất ức chế mTOR

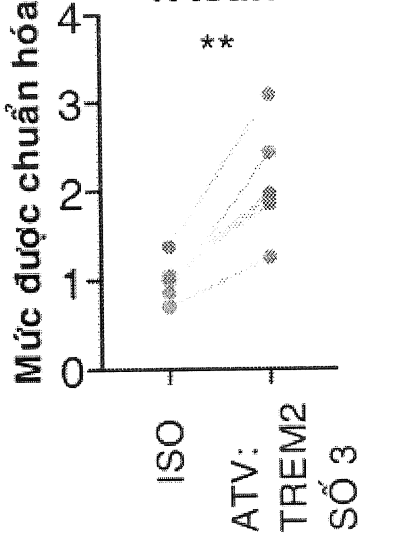
Hình 7B



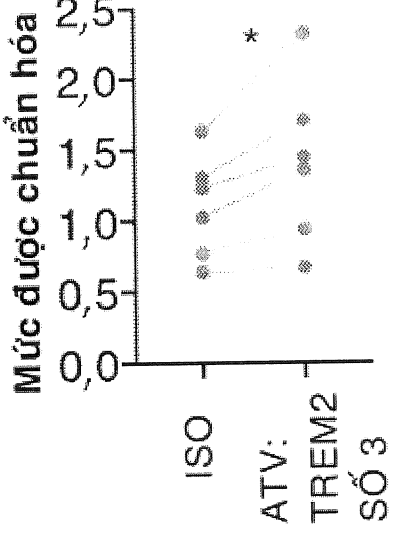
Hình 7C



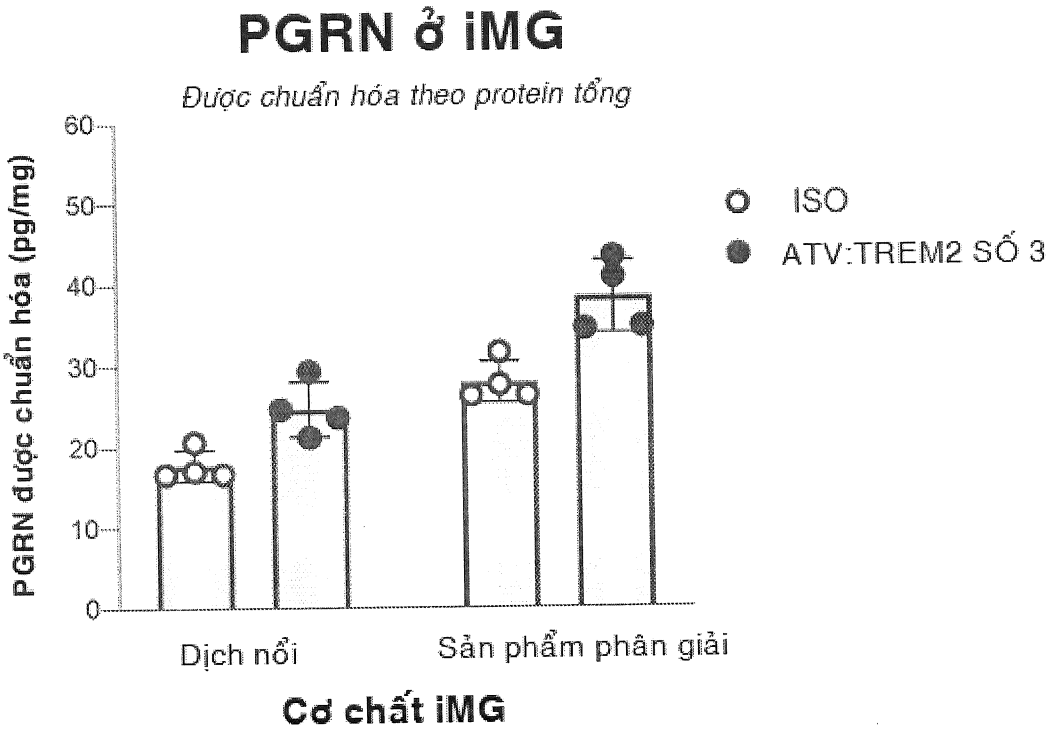
Hình 7D



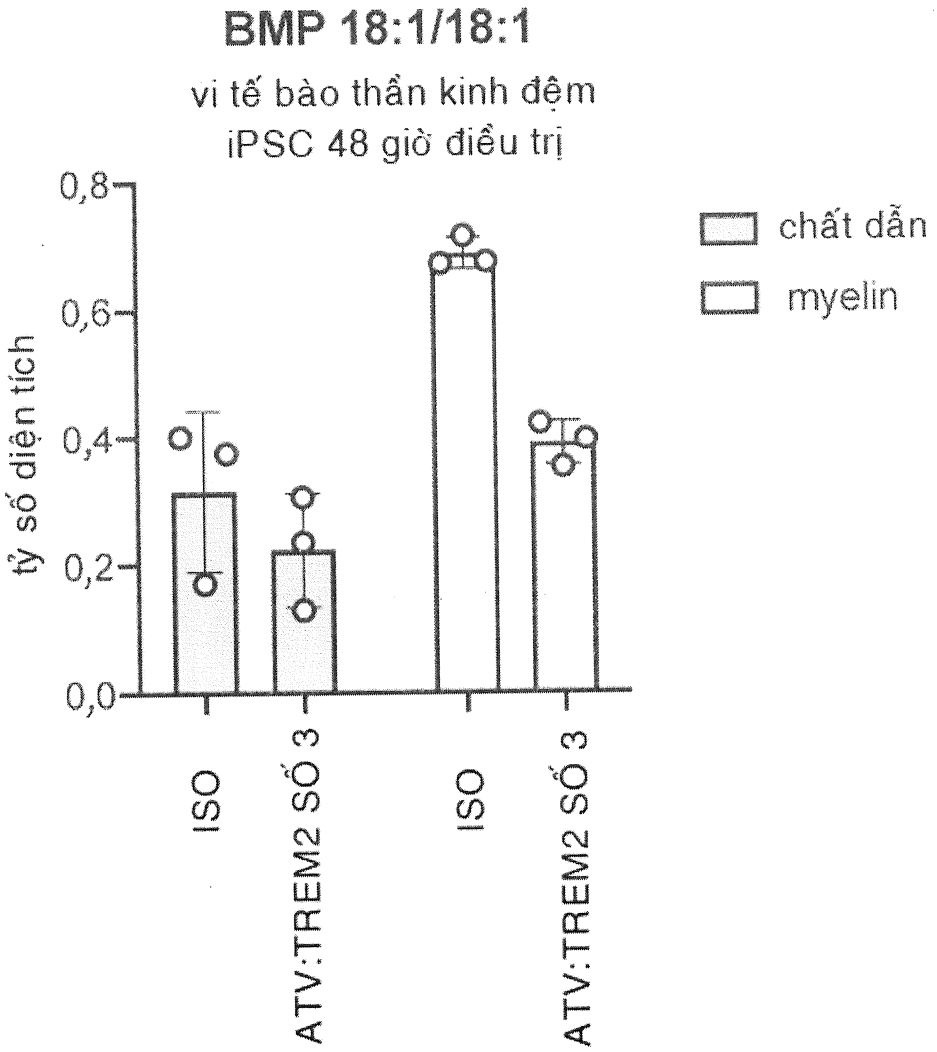
Hình 7E



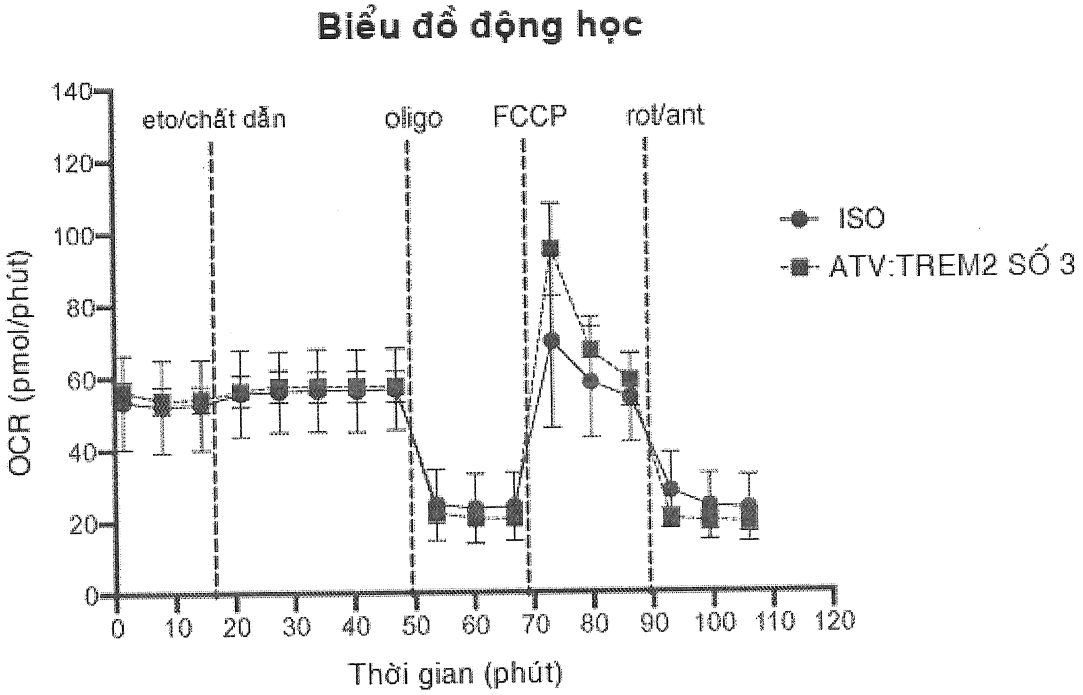
Hình 8


PGRN ở iMG
Được chuẩn hóa theo protein tổng
PGRN được chuẩn hóa (pg/mg)
60
50
40
30
20
10
0
ISO
ATV:TREM2 SỐ 3
Dịch nổi
Sản phẩm phân giải
Cơ chất iMG

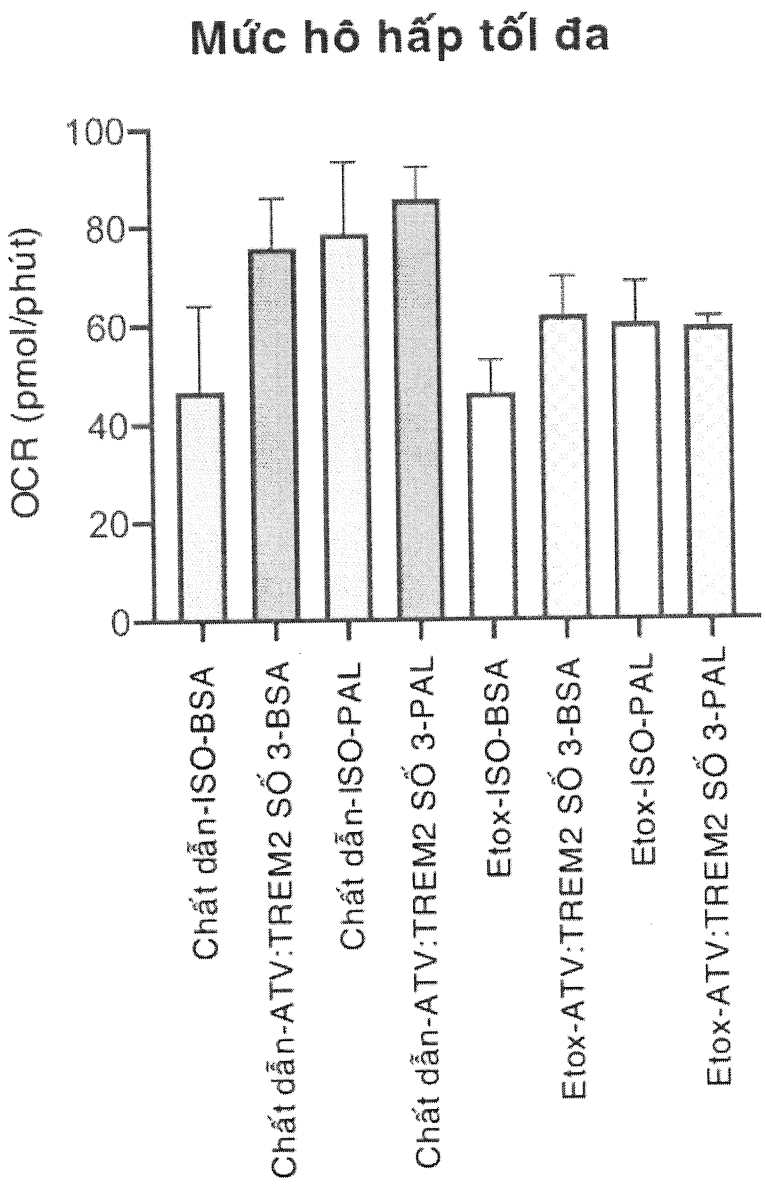
Hình 9


BMP 18:1/18:1
vi tế bào thần kinh đệm
iPSC 48 giờ điều trị
tỷ số diện tích
0,0
0,2
0,4
0,6
0,8
chất dẫn
myelin
ISO
ATV:TREM2 SỐ 3
ISO
ATV:TREM2 SỐ 3

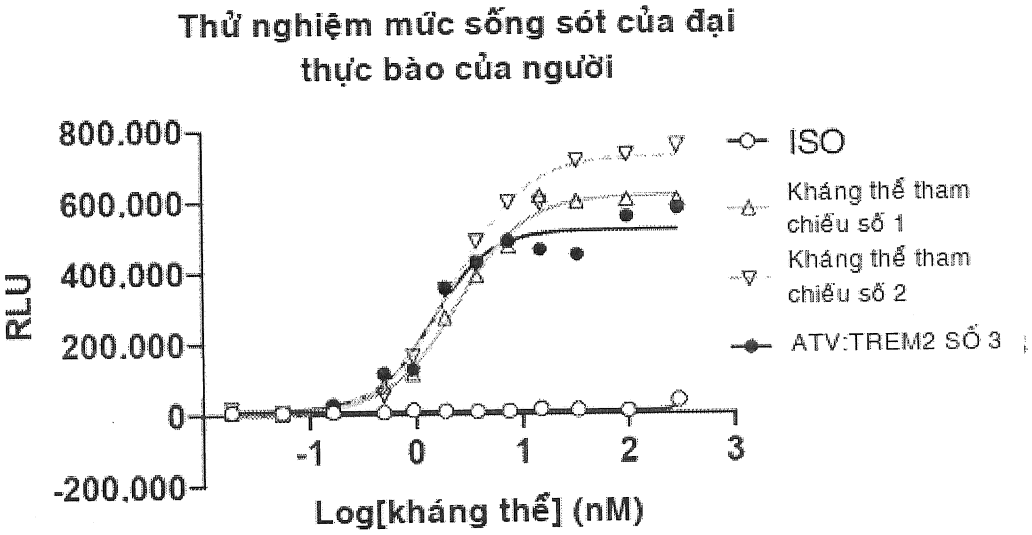
Hình 10A


Biểu đồ động học
eto/chất dẫn
oligo
FCCP
rot/ant
ISO
ATV:TREM2 SỐ 3
OCR (pmol/phút)
Thời gian (phút)
0
20
40
60
80
100
120
140
0
10
20
30
40
50
60
70
80
90
100
110
120

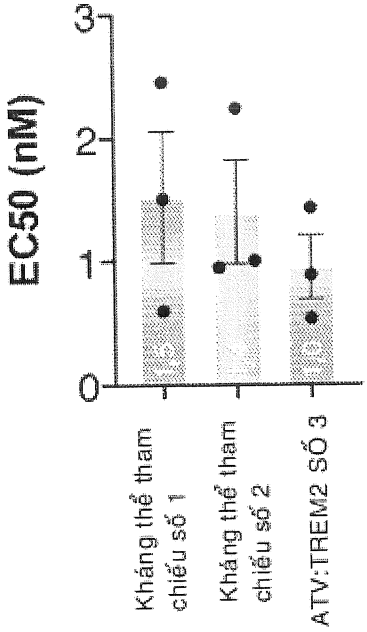
Hình 10B


Mức hô hấp tối đa
OCR (pmol/phút)
100
80
60
40
20
0
Chất dẫn-ISO-BSA
Chất dẫn-ATV:TREM2 SỐ 3-BSA
Chất dẫn-ISO-PAL
Chất dẫn-ATV:TREM2 SỐ 3-PAL
Etox-ISO-BSA
Etox-ATV:TREM2 SỐ 3-BSA
Etox-ISO-PAL
Etox-ATV:TREM2 SỐ 3-PAL

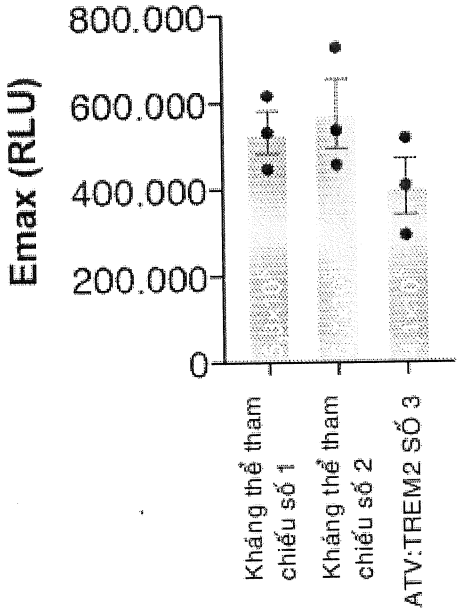
Hình 11A


Thử nghiệm mức sống sót của đại thực bào của người
800.000
600.000
400.000
200.000
0
-200.000
RLU
-1
0
1
2
3
Log[kháng thể] (nM)
ISO
Kháng thể tham chiếu số 1
Kháng thể tham chiếu số 2
ATV:TREM2 SỐ 3

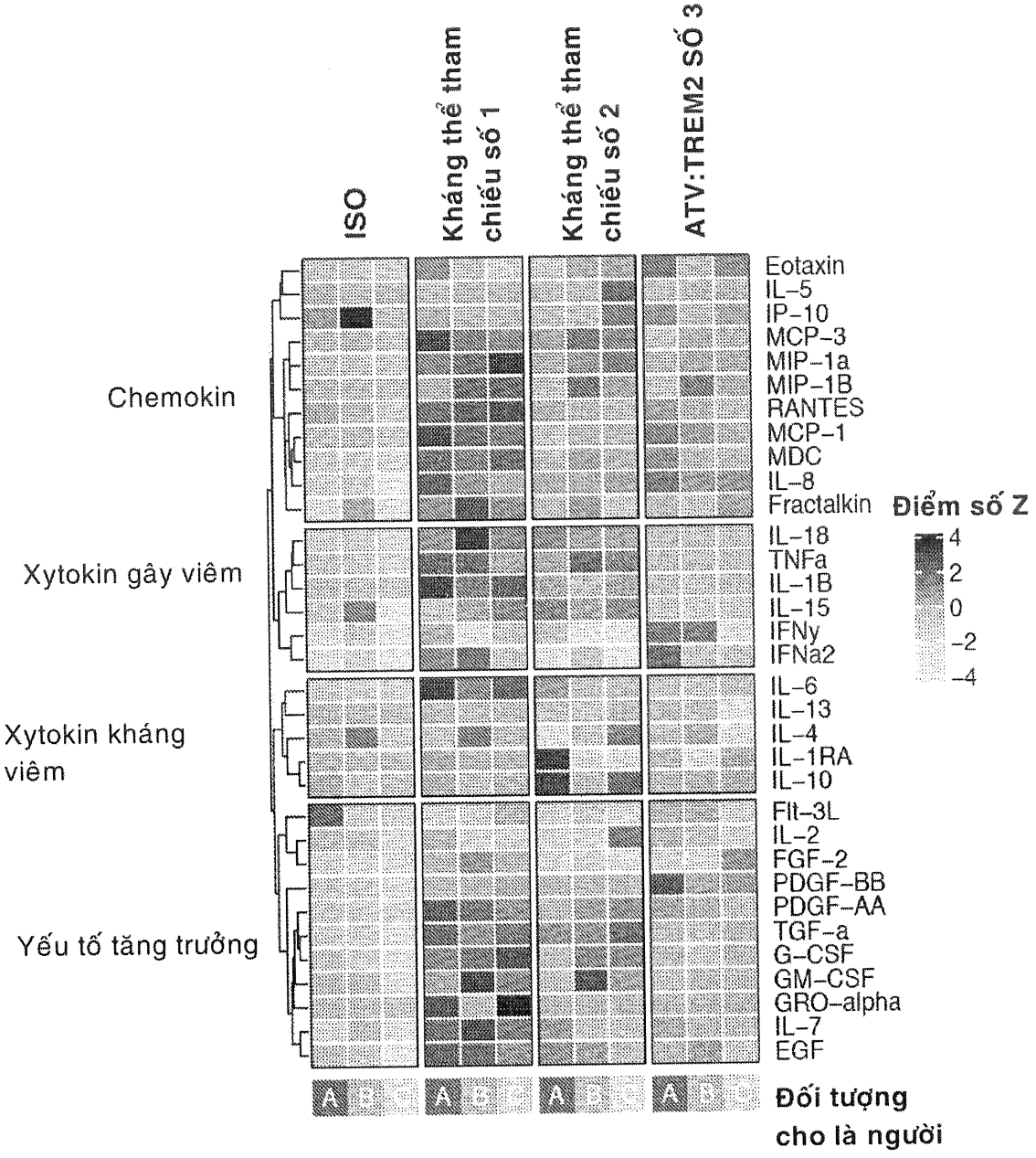
Hình 11B



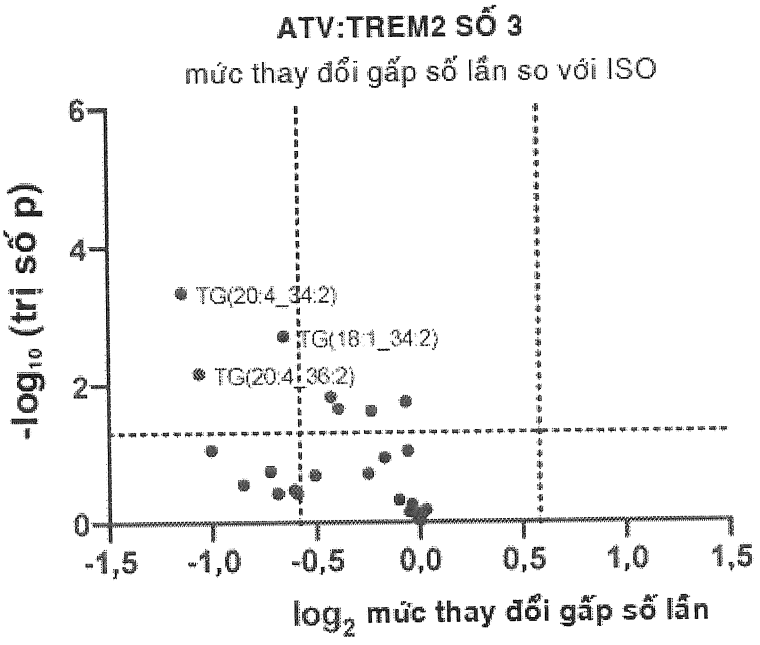
Hình 11C



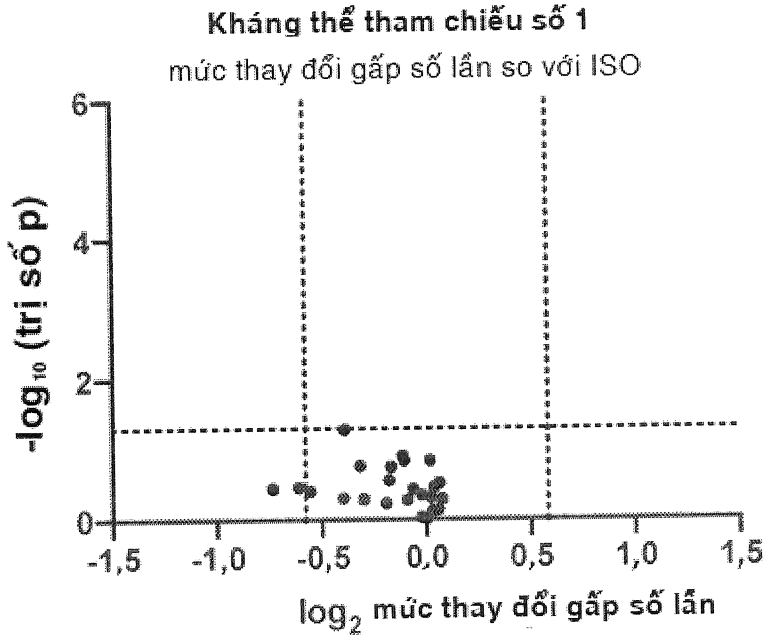
Hình 12


ISO
Kháng thể tham chiếu số 1
Kháng thể tham chiếu số 2
ATV:TREM2 SỐ 3
Chemokin
Xytokin gây viêm
Xytokin kháng viêm
Yếu tố tăng trưởng
Eotaxin
IL-5
IP-10
MCP-3
MIP-1a
MIP-1B
RANTES
MCP-1
MDC
IL-8
Fractalkin
IL-18
TNFa
IL-1B
IL-15
IFNy
IFNa2
IL-6
IL-13
IL-4
IL-1RA
IL-10
Flt-3L
IL-2
FGF-2
PDGF-BB
PDGF-AA
TGF-a
G-CSF
GM-CSF
GRO-alpha
IL-7
EGF
Điểm số Z
4
2
0
-2
-4
A B C
Đối tượng cho là người

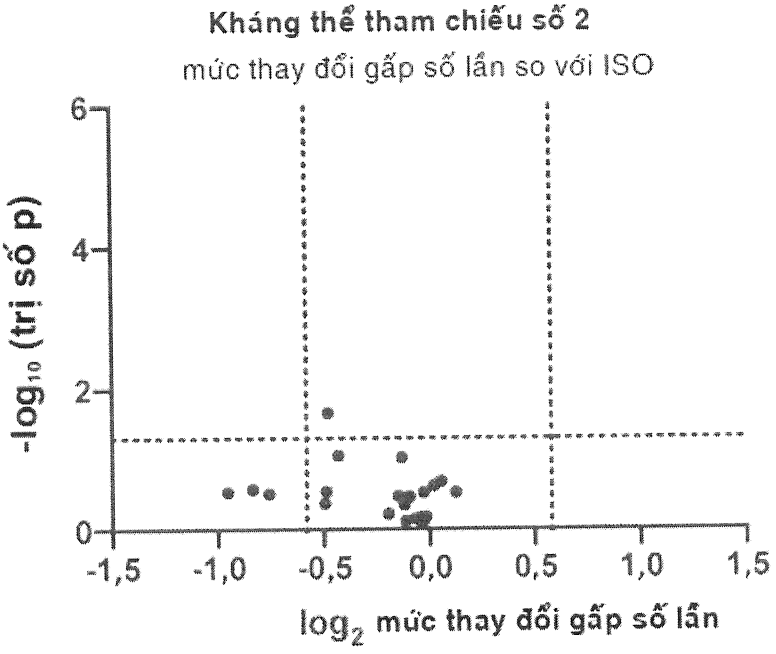
Hình 13A



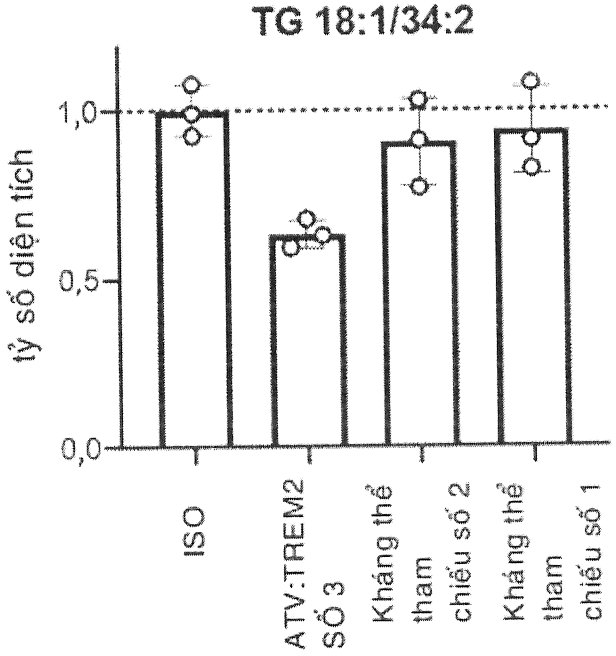
Hình 13B



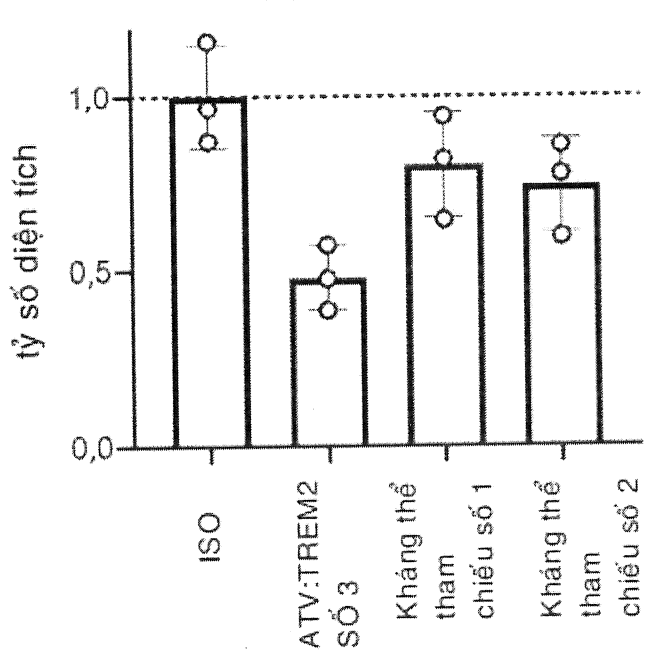
Hình 13C


Kháng thể tham chiếu số 2
mức thay đổi gấp số lần so với ISO
-log10 (trị số p)
6
4
2
0
-1,5
-1,0
-0,5
0,0
0,5
1,0
1,5
log2 mức thay đổi gấp số lần

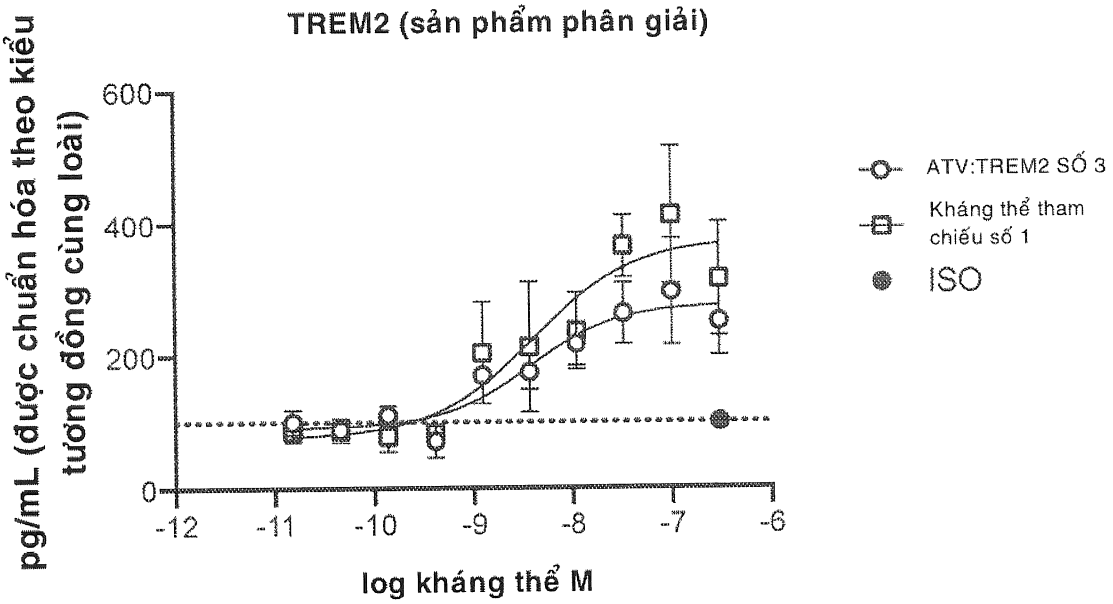
Hình 13D



Hình 13E

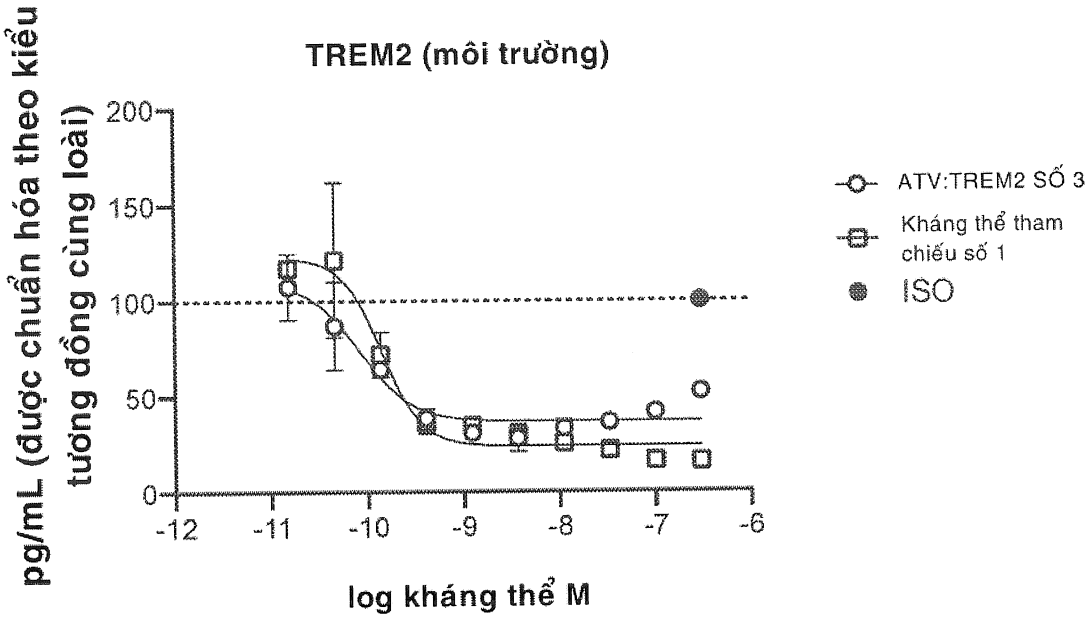


Hình 14A



	ATV:TREM2 SỐ 3	kháng thể tham chiếu số 1
LogEC50	-8,424	-8,386
HillSlope	0,9910	0,8515
EC50	3,768e-009	4,107e-009

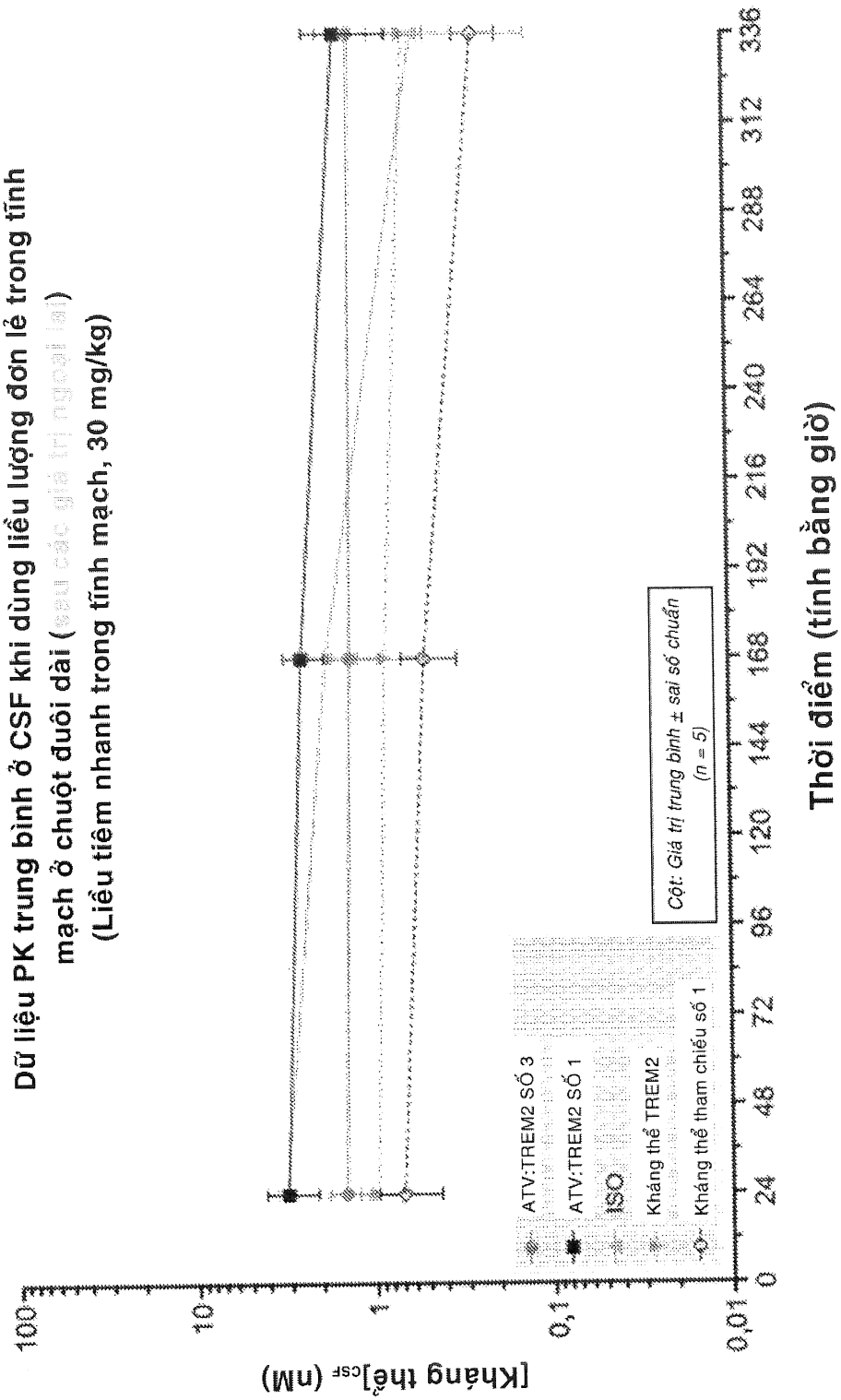
Hình 14B



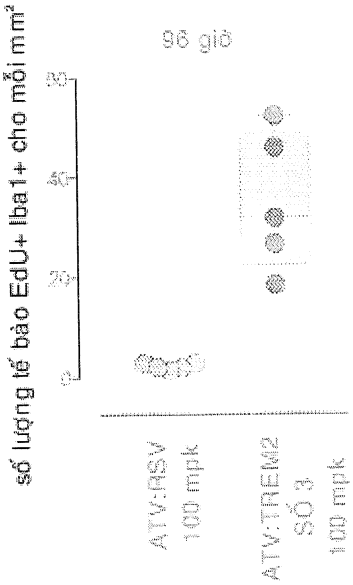
	ATV:TREM2 SỐ 3	kháng thể tham chiếu số 1
LogEC50	-10,07	-9,847
HillSlope	-1,602	-2,100
EC50	8,425e-011	1,423e-010

Hình 15

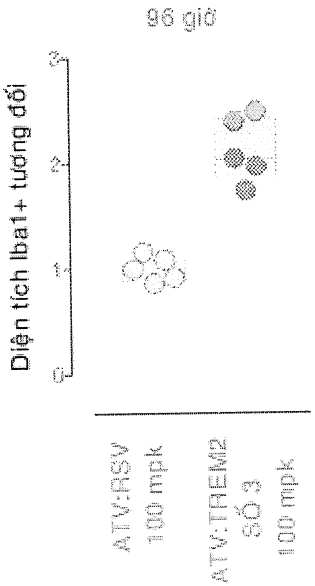
Dữ liệu PK trung bình ở CSF khi dùng liều lượng đơn lẻ trong tĩnh mạch ở chuột đuôi dài (sau các giá trị ngoại lai)
(Liều tiêm nhanh trong tĩnh mạch, 30 mg/kg)



Hình 16A

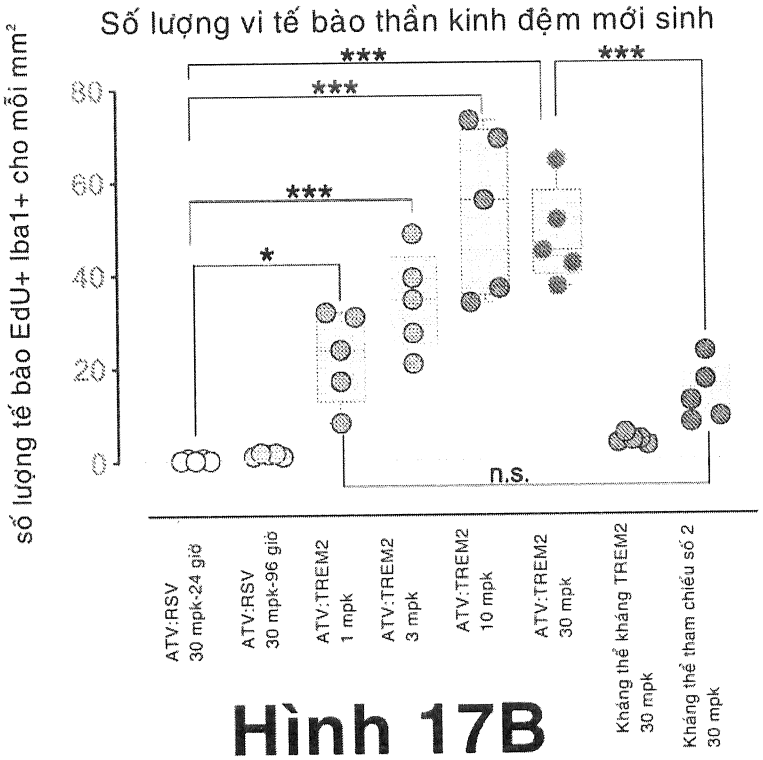


Hình 16B



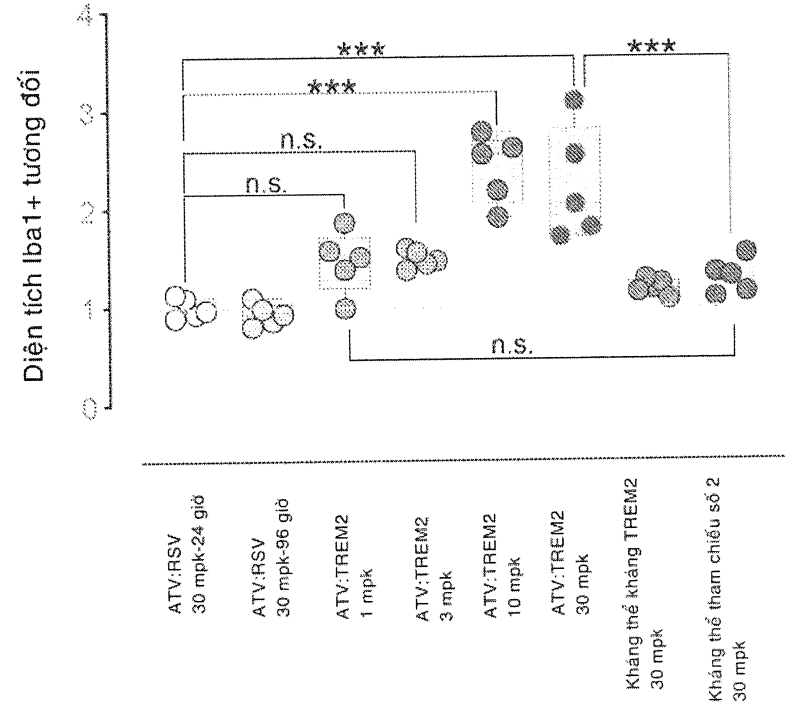
Hình 17A

Số lượng vi tế bào thần kinh đệm mới sinh

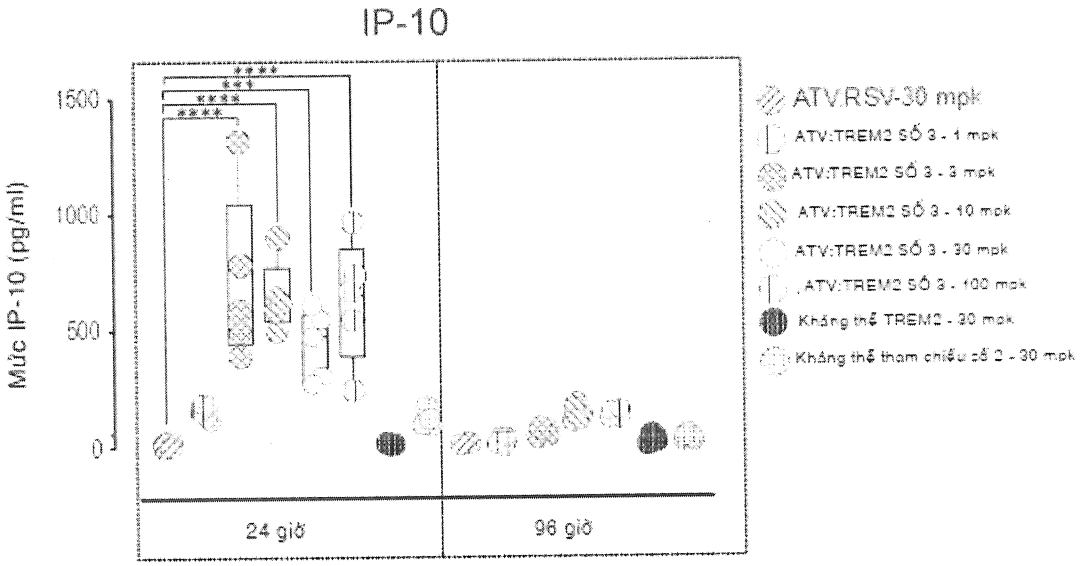


Hình 17B

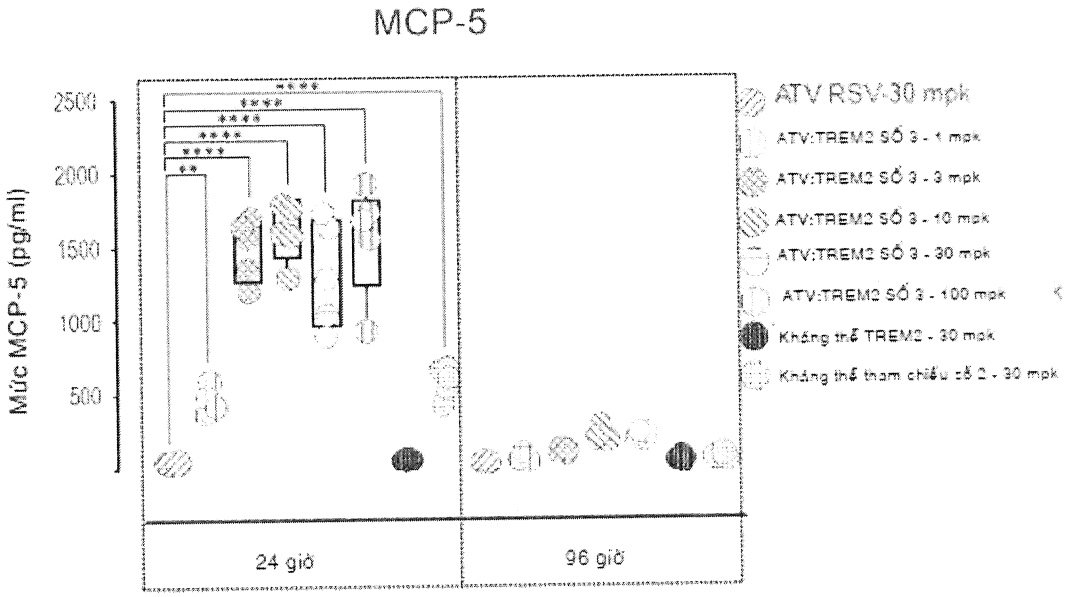
Mức tín hiệu Iba1



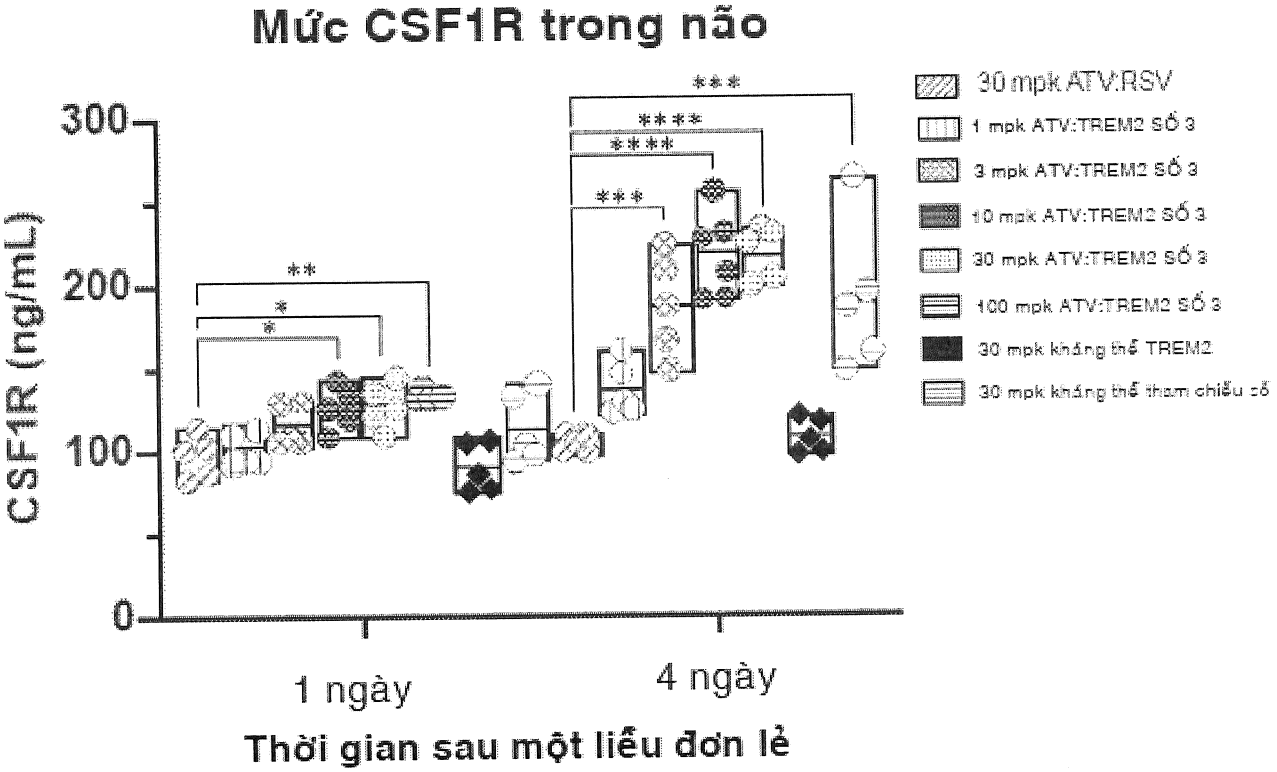
Hình 18A



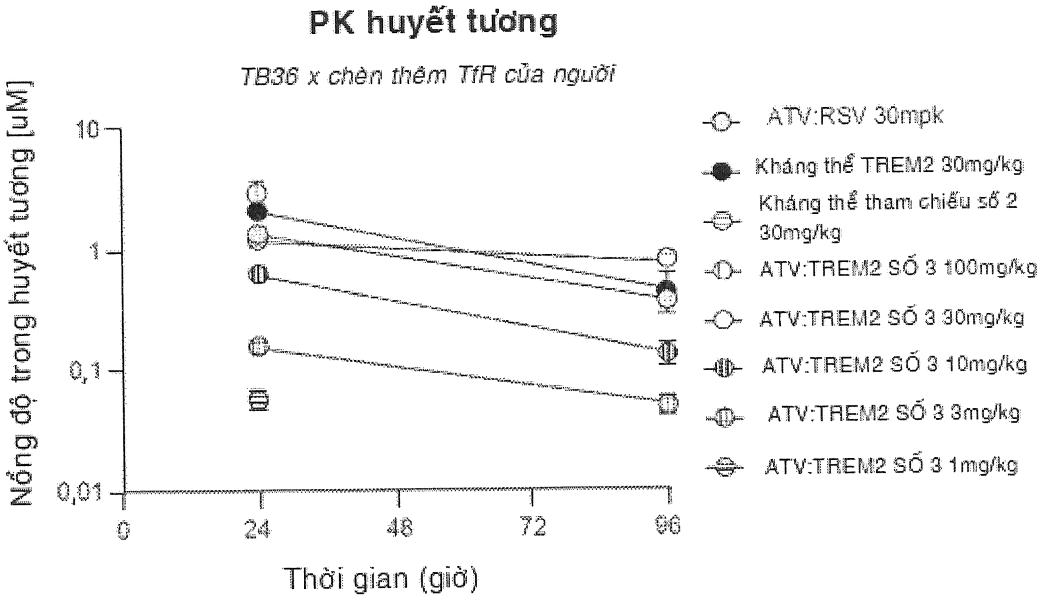
Hình 18B



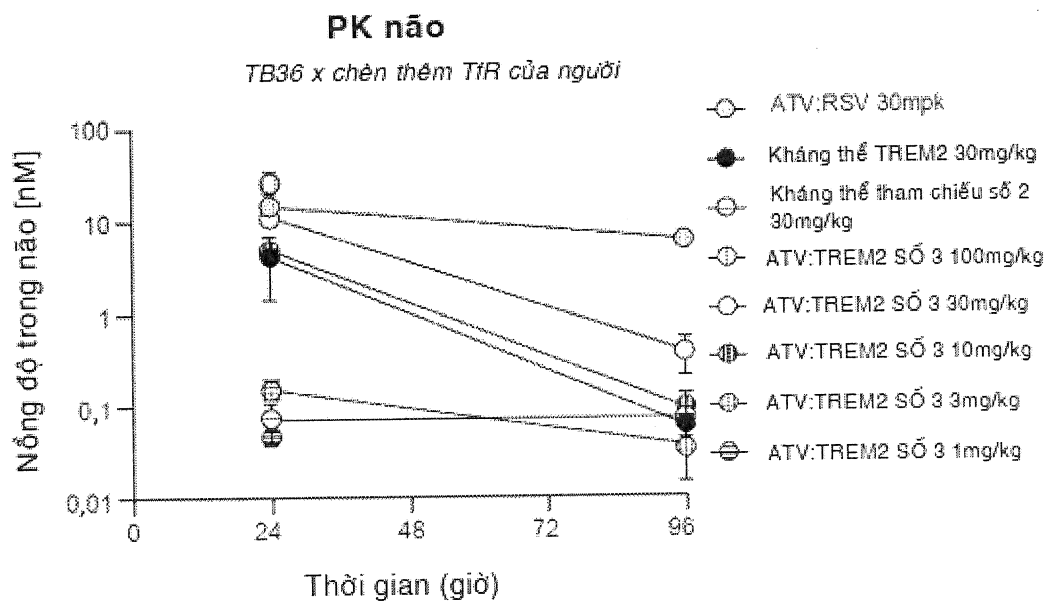
Hình 19


Mức CSF1R trong não
CSF1R (ng/mL)
300
200
100
0
**
*
*
***
****
****
***
1 ngày
4 ngày
Thời gian sau một liều đơn lẻ
30 mpk ATV:RSV
1 mpk ATV:TREM2 SỐ 3
3 mpk ATV:TREM2 SỐ 3
10 mpk ATV:TREM2 SỐ 3
30 mpk ATV:TREM2 SỐ 3
100 mpk ATV:TREM2 SỐ 3
30 mpk kháng thể TREM2
30 mpk kháng thể tham chiếu số

Hình 20



Hình 21



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> DENALI THERAPEUTICS INC.

<120> Kháng thể được phân lập mà liên kết đặc hiệu với TREM2 và dược phẩm chứa kháng thể này

<130> 102342-004030PC-1229813

<140>
<141>

<150> 63/091,717
<151> 14-10-2020

<150> 63/070,728
<151> 26-08-2020

<150> 62/960,663
<151> 13-01-2020

<160> 84

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 230
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 1
Met Glu Pro Leu Arg Leu Leu Ile Leu Leu Phe Val Thr Glu Leu Ser
1 5 10 15

Gly Ala His Asn Thr Thr Val Phe Gln Gly Val Ala Gly Gln Ser Leu
20 25 30

Gln Val Ser Cys Pro Tyr Asp Ser Met Lys His Trp Gly Arg Arg Lys
35 40 45

Ala Trp Cys Arg Gln Leu Gly Glu Lys Gly Pro Cys Gln Arg Val Val
50 55 60

Ser Thr His Asn Leu Trp Leu Leu Ser Phe Leu Arg Arg Trp Asn Gly
65 70 75 80

Ser Thr Ala Ile Thr Asp Asp Thr Leu Gly Gly Thr Leu Thr Ile Thr
85 90 95

Leu Arg Asn Leu Gln Pro His Asp Ala Gly Leu Tyr Gln Cys Gln Ser
100 105 110

Leu His Gly Ser Glu Ala Asp Thr Leu Arg Lys Val Leu Val Glu Val
115 120 125

Leu Ala Asp Pro Leu Asp His Arg Asp Ala Gly Asp Leu Trp Phe Pro
130 135 140

Gly Glu Ser Glu Ser Phe Glu Asp Ala His Val Glu His Ser Ile Ser
145 150 155 160

Arg Ser Leu Leu Glu Gly Glu Ile Pro Phe Pro Pro Thr Ser Ile Leu
165 170 175

Leu Leu Leu Ala Cys Ile Phe Leu Ile Lys Ile Leu Ala Ala Ser Ala
180 185 190

Leu Trp Ala Ala Ala Trp His Gly Gln Lys Pro Gly Thr His Pro Pro
195 200 205

Ser Glu Leu Asp Cys Gly His Asp Pro Gly Tyr Gln Leu Gln Thr Leu
210 215 220

Pro Gly Leu Arg Asp Thr
225 230

<210> 2
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 2
Glu Val Lys Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Pro Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Ile

65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Ser Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 3
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 3
Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Ala Leu Pro Asn Pro Val Pro Ser Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Thr Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
50 55 60

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

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

Leu Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 4
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 4
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 5
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 5
Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 6
Ala Arg Leu Ser Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 7
Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 8
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 8
Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser
1 5

<210> 9
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 9
Gln Gln Phe Leu Glu Phe Pro Phe Thr
1 5

<210> 10
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 10
Glu Val Lys Leu Leu 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 Thr Asn Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Arg Ala Pro Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Arg Asn Arg Pro Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Ser Thr Leu Arg Ala Asp Asp Thr Ala Phe Tyr
85 90 95

Tyr Cys Thr Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 11
Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Ala Leu Pro Asn Pro Val Pro Ser Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Thr Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
50 55 60

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

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

Leu Glu Phe Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 12
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 12
Gly Phe Thr Phe Thr Asn Phe Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 13

<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 13
Val Ile Arg Asn Arg Pro Asn Gly Tyr Thr Thr Asp Tyr Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 14
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 14
Thr Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 15
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 15
Glu Val Lys Leu Leu Asp Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Ala Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

Tyr Met Ser Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Pro Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Thr Gln Asn Ile
65 70 75 80

Leu Tyr Leu Gln Met Asn Thr Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Ile Tyr
85 90 95

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Val
100 105 110

Met Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 16
Asp Ile Val Met Thr Gln Gly Ala Leu Pro Asn Pro Val Pro Ser Gly
1 5 10 15

Glu Ser Ala Ser Ile Thr Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr Arg Ala Ser Gly Val Ser
50 55 60

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

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

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

<210> 17
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn

<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 17
Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 18
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 18
Gln Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 19
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 19
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 20
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr 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 Gln Gln Phe
85 90 95

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

<210> 21
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 21
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 Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

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

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 22
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr 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 Gln Gln Phe
85 90 95

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

<210> 23
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 23
Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Thr Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 24
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 24
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 25
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 25
Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 26
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 26
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 Gly Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 27
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 27
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

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

<210> 28
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Asn"

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (1)..(10)
<223> /ghi chú="Các gốc biến thể được đưa ra ở trình tự này không có

sự ưu tiên so với các gốc ở các phần chú thích
đối với các vị trí biến thể"

<400> 28
Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe Tyr Met Ser
1 5 10

<210> 29
<211> 19
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (5)..(5)
<223> /thay thế="Arg"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Pro"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (8)..(8)
<223> /thay thế="Ala"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (11)..(11)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (12)..(12)
<223> /thay thế="Asp"

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (1)..(19)
<223> /ghi chú="Các gốc biến thể được đưa ra ở trình tự này không có
sự ưu tiên so với các gốc ở các phần chú thích
đối với các vị trí biến thể"

<400> 29
Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Gly Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro Ser
1 5 10 15

Val Lys Gly

<210> 30
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (1)..(1)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (4)..(4)
<223> /thay thế="Ser"

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (1)..(9)
<223> /ghi chú="Các gốc biến thể được đưa ra ở trình tự này không có
sự ưu tiên so với các gốc ở các phần chú thích
đối với các vị trí biến thể"

<400> 30
Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr
1 5

<210> 31
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (10)..(10)
<223> /thay thế="Thr"

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (1)..(16)
<223> /ghi chú="Các gốc biến thể được đưa ra ở trình tự này không có
sự ưu tiên so với các gốc ở các phần chú thích
đối với các vị trí biến thể"

<400> 31
Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Lys Thr Tyr Leu Asn
1 5 10 15

<210> 32
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> BIẾN THỂ
<222> (6)..(6)
<223> /thay thế="Phe"

<220>
<221> VỊ TRÍ
<222> (1)..(9)
<223> /ghi chú="Các gốc biến thể được đưa ra ở trình tự này không có
sự ưu tiên so với các gốc ở các phần chú thích
đối với các vị trí biến thể"

<400> 32
Gln Gln Phe Leu Glu Tyr Pro Phe Thr
1 5

<210> 33

<400> 33
000

<210> 34
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 34
Gly Gly Gly Gly Ser
1 5

<210> 35
<211> 6
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: thẻ 6xHis tổng hợp"

<400> 35
His His His His His His
1 5

<210> 36
<211> 113
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 36
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
1 5 10 15

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

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
85 90 95

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys
100 105 110

Pro

<210> 37
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 37
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> 38
<211> 217
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 38
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 39
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 39
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 40
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 40
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Trp Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 41
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 41
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

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

35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Trp Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 42
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 42
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg

245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Trp Trp Glu Ser
370 375 380

Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Ser Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu
405 410 415

Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 43
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 43
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Phe Gly Thr Glu Trp Ser Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 44

<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 44
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Phe Gly Thr Glu Trp Ser Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 45
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 45
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Phe Gly Thr Glu Trp Ser Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu
405 410 415

Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 46
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 46
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Val Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 47
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 47
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Val Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 48
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 48
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Tyr Gly Thr Glu Trp Val Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu
405 410 415

Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 49
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 49
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

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

85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln
195 200 205

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 50
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 50
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 51
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 51
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu
405 410 415

Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 52
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 52
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 53
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 53
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 54
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 54
Asp Ile Val Met Thr Gln Thr Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Gln Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Trp Met Ser Thr 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 Gln Gln Phe
85 90 95

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

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

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

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

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

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

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

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

<210> 55
<211> 181
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 55
Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg Leu Val Tyr Leu Val
1 5 10 15

Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys Ala Ala Thr Val Thr
20 25 30

Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys Lys Asp Phe Glu Asp
35 40 45

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

Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu Ser Leu Asn Ala Ile
65 70 75 80

Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe Pro Ile Val Asn Ala
85 90 95

Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly Thr Gly Asp Pro Tyr
100 105 110

Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln Phe Pro Pro Ser Arg
115 120 125

Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr Ile Ser Arg Ala Ala
130 135 140

Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp Cys Pro Ser Asp Trp
145 150 155 160

Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser Glu Ser Lys Asn Val
165 170 175

Lys Leu Thr Val Ser
180

<210> 56
<211> 10
<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<400> 56
Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser
1 5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 57
Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
1 5 10

<210> 58
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Peptit tổng hợp"

<220>
<221> GỐC ĐƯỢC CẢI BIẾN
<222> (2)..(2)
<223> Axit amin bất kỳ

<400> 58
Tyr Xaa Thr Glu Trp Ser Ser
1 5

<210> 59
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp peptide"

<220>
<221> GỐC ĐƯỢC CẢI BIẾN
<222> (2)..(3)
<223> Axit amin bất kỳ

<220>
<221> GỐC ĐƯỢC CẢI BIẾN

<222> (5)..(8)
<223> Axit amin bất kỳ

<400> 59
Thr Xaa Xaa Glu Xaa Xaa Xaa Xaa Phe
1 5

<210> 60
<211> 760
<212> PRT
<213> Khỉ đuôi dài

<400> 60
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Gly Val Asp Glu Glu Glu Asn Thr
35 40 45

Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Gly Thr Lys Pro Lys Arg Cys Gly Gly
50 55 60

Asn Ile Cys Tyr Gly Thr Ile Ala Val Ile Ile Phe Phe Leu Ile Gly
65 70 75 80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
85 90 95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Ala Arg Glu Glu Pro
100 105 110

Glu Glu Asp Phe Pro Ala Ala Pro Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
115 120 125

Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Thr Thr Asp Phe Thr Ser Thr Ile
130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Leu Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
145 150 155 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Ile Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val

180 185 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Gly
195 200 205

Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
210 215 220

Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
225 230 235 240

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

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
260 265 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe
275 280 285

Pro Ile Val Lys Ala Asp Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
290 295 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
305 310 315 320

Phe Pro Pro Ser Gln Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
325 330 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp
340 345 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Lys Met Val Thr Ser
355 360 365

Glu Asn Lys Ser Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Thr
370 375 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala
405 410 415

Ala Lys Ser Ser Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr
450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr
465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val
485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asp
500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Arg Ser Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp
515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe
530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp
545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu
565 570 575

Val Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu
580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Thr Glu Leu Asn
595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Leu Phe Leu Arg Asp
610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Val Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
645 650 655

Thr Thr Asp Phe Arg Asn Ala Glu Lys Arg Asp Lys Phe Val Met Lys
660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr Tyr Phe Leu Ser Pro
675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Ser Ala Leu Leu Glu Ser Leu Lys Leu Arg Arg
705 710 715 720

Gln Asn Asn Ser Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
725 730 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
755 760

<210> 61
<211> 217
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 61
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
210 215

<210> 62
<211> 760
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 62
Met Met Asp Gln Ala Arg Ser Ala Phe Ser Asn Leu Phe Gly Gly Glu
1 5 10 15

Pro Leu Ser Tyr Thr Arg Phe Ser Leu Ala Arg Gln Val Asp Gly Asp
20 25 30

Asn Ser His Val Glu Met Lys Leu Ala Val Asp Glu Glu Glu Asn Ala
35 40 45

Asp Asn Asn Thr Lys Ala Asn Val Thr Lys Pro Lys Arg Cys Ser Gly
50 55 60

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

65 70 75 80

Phe Met Ile Gly Tyr Leu Gly Tyr Cys Lys Gly Val Glu Pro Lys Thr
85 90 95

Glu Cys Glu Arg Leu Ala Gly Thr Glu Ser Pro Val Arg Glu Glu Pro
100 105 110

Gly Glu Asp Phe Pro Ala Ala Arg Arg Leu Tyr Trp Asp Asp Leu Lys
115 120 125

Arg Lys Leu Ser Glu Lys Leu Asp Ser Thr Asp Phe Thr Gly Thr Ile
130 135 140

Lys Leu Leu Asn Glu Asn Ser Tyr Val Pro Arg Glu Ala Gly Ser Gln
145 150 155 160

Lys Asp Glu Asn Leu Ala Leu Tyr Val Glu Asn Gln Phe Arg Glu Phe
165 170 175

Lys Leu Ser Lys Val Trp Arg Asp Gln His Phe Val Lys Ile Gln Val
180 185 190

Lys Asp Ser Ala Gln Asn Ser Val Ile Ile Val Asp Lys Asn Gly Arg
195 200 205

Leu Val Tyr Leu Val Glu Asn Pro Gly Gly Tyr Val Ala Tyr Ser Lys
210 215 220

Ala Ala Thr Val Thr Gly Lys Leu Val His Ala Asn Phe Gly Thr Lys
225 230 235 240

Lys Asp Phe Glu Asp Leu Tyr Thr Pro Val Asn Gly Ser Ile Val Ile
245 250 255

Val Arg Ala Gly Lys Ile Thr Phe Ala Glu Lys Val Ala Asn Ala Glu
260 265 270

Ser Leu Asn Ala Ile Gly Val Leu Ile Tyr Met Asp Gln Thr Lys Phe
275 280 285

Pro Ile Val Asn Ala Glu Leu Ser Phe Phe Gly His Ala His Leu Gly
290 295 300

Thr Gly Asp Pro Tyr Thr Pro Gly Phe Pro Ser Phe Asn His Thr Gln
305 310 315 320

Phe Pro Pro Ser Arg Ser Ser Gly Leu Pro Asn Ile Pro Val Gln Thr
325 330 335

Ile Ser Arg Ala Ala Ala Glu Lys Leu Phe Gly Asn Met Glu Gly Asp
340 345 350

Cys Pro Ser Asp Trp Lys Thr Asp Ser Thr Cys Arg Met Val Thr Ser
355 360 365

Glu Ser Lys Asn Val Lys Leu Thr Val Ser Asn Val Leu Lys Glu Ile
370 375 380

Lys Ile Leu Asn Ile Phe Gly Val Ile Lys Gly Phe Val Glu Pro Asp
385 390 395 400

His Tyr Val Val Val Gly Ala Gln Arg Asp Ala Trp Gly Pro Gly Ala
405 410 415

Ala Lys Ser Gly Val Gly Thr Ala Leu Leu Leu Lys Leu Ala Gln Met
420 425 430

Phe Ser Asp Met Val Leu Lys Asp Gly Phe Gln Pro Ser Arg Ser Ile
435 440 445

Ile Phe Ala Ser Trp Ser Ala Gly Asp Phe Gly Ser Val Gly Ala Thr
450 455 460

Glu Trp Leu Glu Gly Tyr Leu Ser Ser Leu His Leu Lys Ala Phe Thr
465 470 475 480

Tyr Ile Asn Leu Asp Lys Ala Val Leu Gly Thr Ser Asn Phe Lys Val
485 490 495

Ser Ala Ser Pro Leu Leu Tyr Thr Leu Ile Glu Lys Thr Met Gln Asn
500 505 510

Val Lys His Pro Val Thr Gly Gln Phe Leu Tyr Gln Asp Ser Asn Trp
515 520 525

Ala Ser Lys Val Glu Lys Leu Thr Leu Asp Asn Ala Ala Phe Pro Phe
530 535 540

Leu Ala Tyr Ser Gly Ile Pro Ala Val Ser Phe Cys Phe Cys Glu Asp
545 550 555 560

Thr Asp Tyr Pro Tyr Leu Gly Thr Thr Met Asp Thr Tyr Lys Glu Leu
565 570 575

Ile Glu Arg Ile Pro Glu Leu Asn Lys Val Ala Arg Ala Ala Ala Glu
580 585 590

Val Ala Gly Gln Phe Val Ile Lys Leu Thr His Asp Val Glu Leu Asn
595 600 605

Leu Asp Tyr Glu Arg Tyr Asn Ser Gln Leu Leu Ser Phe Val Arg Asp
610 615 620

Leu Asn Gln Tyr Arg Ala Asp Ile Lys Glu Met Gly Leu Ser Leu Gln
625 630 635 640

Trp Leu Tyr Ser Ala Arg Gly Asp Phe Phe Arg Ala Thr Ser Arg Leu
645 650 655

Thr Thr Asp Phe Gly Asn Ala Glu Lys Thr Asp Arg Phe Val Met Lys
660 665 670

Lys Leu Asn Asp Arg Val Met Arg Val Glu Tyr His Phe Leu Ser Pro
675 680 685

Tyr Val Ser Pro Lys Glu Ser Pro Phe Arg His Val Phe Trp Gly Ser
690 695 700

Gly Ser His Thr Leu Pro Ala Leu Leu Glu Asn Leu Lys Leu Arg Lys
705 710 715 720

Gln Asn Asn Gly Ala Phe Asn Glu Thr Leu Phe Arg Asn Gln Leu Ala
725 730 735

Leu Ala Thr Trp Thr Ile Gln Gly Ala Ala Asn Ala Leu Ser Gly Asp
740 745 750

Val Trp Asp Ile Asp Asn Glu Phe
755 760

<210> 63
<211> 216

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 63
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 64
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 64
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Trp Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Ser
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 65
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 65
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn

145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Trp Trp Glu Ser
370 375 380

Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Ser Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu
405 410 415

Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 66
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 66
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro

130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Phe Gly Thr Glu Trp Ser Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 67
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 67
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

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

340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Phe Gly Thr Glu Trp Ser Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu
405 410 415

Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 68
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 68
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Val Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 69
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 69
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

```
Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr
65                  70                  75                  80

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
            100                 105                 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
        115                 120                 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
    130                 135                 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145                 150                 155                 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
                165                 170                 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
            180                 185                 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
        195                 200                 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
    210                 215                 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225                 230                 235                 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
            260                 265                 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
        275                 280                 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
    290                 295                 300
```

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Tyr Gly Thr Glu Trp Val Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr Lys Glu
405 410 415

Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 70
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 70
Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro
130 135 140

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu
165 170 175

Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215

<210> 71
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 71
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Ser Lys Glu
405 410 415

Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 72
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 72

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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 73
<211> 447
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 73
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 Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser
180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser Cys
355 360 365

Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Leu His Glu Ala
420 425 430

Leu His Ser His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 74
<211> 453

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 74
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Leu Arg Asn Gln Pro Gly Glu Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 75
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 75
Asp Val Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

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

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

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

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

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

Thr Arg Val Pro Tyr 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> 76
<211> 453
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 76
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1 5 10 15

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

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

Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Ala Gly Lys Phe
50 55 60

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

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

Ala Arg Leu Leu Arg Asn Gln Pro Gly Glu Ser Tyr Ala Met Asp Tyr
100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly
115 120 125

Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly
130 135 140

Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val
145 150 155 160

Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
165 170 175

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val
180 185 190

Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val
195 200 205

Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys
210 215 220

Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu
225 230 235 240

Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr
245 250 255

Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val
260 265 270

Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val
275 280 285

Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser
290 295 300

Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu
305 310 315 320

Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
325 330 335

Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro
340 345 350

Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln
355 360 365

Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala
370 375 380

Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr
385 390 395 400

Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
405 410 415

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser
420 425 430

Val Met His Gly Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser
435 440 445

Leu Ser Pro Gly Lys
450

<210> 77
<211> 445
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 77
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu
1 5 10 15

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

Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp
35 40 45

Ile Gly Tyr Met Ser Tyr Ser Gly Ser Thr Arg Tyr Asn Pro Ser Leu
50 55 60

Arg Ser Arg Val Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser
65 70 75 80

Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro
115 120 125

Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val
130 135 140

Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
145 150 155 160

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly
165 170 175

Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly
180 185 190

Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
195 200 205

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys
210 215 220

Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu
225 230 235 240

Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu
245 250 255

Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys
260 265 270

Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu
290 295 300

Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys
305 310 315 320

Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys
325 330 335

Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser
340 345 350

Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys
355 360 365

Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln
370 375 380

Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly
385 390 395 400

Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln
405 410 415

Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn
420 425 430

His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 78
<211> 214
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 78
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly
1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Ser Ser Ser Val Ser Tyr Met
20 25 30

Tyr Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Tyr Pro Pro Ile
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala
100 105 110

Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala
130 135 140

Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
165 170 175

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

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

Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 79
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 79
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val

65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Glu Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Trp Trp
370 375 380

Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Ser Ser Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr
405 410 415

Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 80
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 80
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln
1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu

35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Glu Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Tyr Gly Thr Glu Trp Val Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Thr
405 410 415

Lys Glu Glu Trp Gln Gln Gly Phe Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 81
<211> 450
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 81
Gln Val Thr Leu Arg Glu Ser Gly Pro Ala Leu Val Lys Pro Thr Gln

1 5 10 15

Thr Leu Thr Leu Thr Cys Thr Phe Ser Gly Phe Ser Leu Ser Thr Ser
20 25 30

Gly Met Ser Val Gly Trp Ile Arg Gln Pro Pro Gly Lys Ala Leu Glu
35 40 45

Trp Leu Ala Asp Ile Trp Trp Asp Asp Lys Lys Asp Tyr Asn Pro Ser
50 55 60

Leu Lys Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Thr Ser Lys Asn Gln Val
65 70 75 80

Val Leu Lys Val Thr Asn Met Glu Pro Ala Asp Thr Ala Thr Tyr Tyr
85 90 95

Cys Ala Arg Ser Met Ile Thr Asn Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala
100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
115 120 125

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala
130 135 140

Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser
145 150 155 160

Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val
165 170 175

Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro
180 185 190

Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys
195 200 205

Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp
210 215 220

Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly
225 230 235 240

Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile
245 250 255

Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu
260 265 270

Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg
290 295 300

Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys
305 310 315 320

Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu
325 330 335

Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr
340 345 350

Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
355 360 365

Ser Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp
370 375 380

Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val
385 390 395 400

Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp
405 410 415

Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His
420 425 430

Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro
435 440 445

Gly Lys
450

<210> 82
<211> 213
<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 82
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Cys Gln Leu Ser Val Gly Tyr Met
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
35 40 45

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

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

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Phe Thr
85 90 95

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro
100 105 110

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
115 120 125

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
130 135 140

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
145 150 155 160

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
165 170 175

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

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
195 200 205

Asn Arg Gly Glu Cys
210

<210> 83
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 83
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Thr Asp Phe
20 25 30

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

Ser Val Ile Arg Asn Lys Ala Asn Ala Tyr Thr Ala Gly Tyr Asn Pro
50 55 60

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

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

Tyr Cys Ala Arg Leu Thr Tyr Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly Thr
100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro
115 120 125

Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly
130 135 140

Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn
145 150 155 160

Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln
165 170 175

Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser

180 185 190

Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
195 200 205

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr
210 215 220

His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro Ser
225 230 235 240

Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro
260 265 270

Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala
275 280 285

Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val
290 295 300

Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr
305 310 315 320

Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
325 330 335

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu
340 345 350

Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys
355 360 365

Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser
370 375 380

Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp
385 390 395 400

Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser
405 410 415

Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala
420 425 430

Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys
435 440 445

<210> 84
<211> 216
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<221> nguồn
<223> /ghi chú="Mô tả về Trình tự Nhân tạo: Polypeptit tổng hợp"

<400> 84
Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys
1 5 10 15

Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val
20 25 30

Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr
35 40 45

Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu
50 55 60

Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His
65 70 75 80

Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys
85 90 95

Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln
100 105 110

Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu
115 120 125

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

Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
145 150 155 160

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu

165 170 175

Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val
180 185 190

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

Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
210 215