



(12) **BẢN MÔ TẢ SÁNG CHẾ THUỘC BẢNG ĐỘC QUYỀN SÁNG CHẾ**

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

(11) 
1-0022189

(51)⁷ **C07K 16/18**

(13) **B**

-
- | | | | | | |
|------|--|------------|------------|-----------------|------------|
| (21) | 1-2009-00285 | (22) | 13.07.2007 | | |
| (86) | PCT/US2007/073504 | 13.07.2007 | (87) | WO2008/011348A2 | 24.01.2008 |
| (30) | 06014730.3 | 14.07.2006 | EP | | |
| | 06020765.1 | 02.10.2006 | EP | | |
| | 60/943,289 | 11.06.2007 | US | | |
| | 60/943,499 | 12.06.2007 | US | | |
| (45) | 25.11.2019 | 380 | (43) | 26.04.2010 | 265 |
| (73) | 1. AC IMMUNE S.A. (CH)
EPFL-PSE Building B, CH-1015 Lausanne (CH) | | | | |
| | 2. GENENTECH, INC. (US)
1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990 (US) | | | | |
| (72) | PFEIFER, Andrea (DE), PIHLGREN, Maria (SE), MUHS, Andreas (DE), WATTS, Ryan (US) | | | | |
| (74) | Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH) | | | | |
-

(54) **KHÁNG THỂ ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH THOÁI HÓA DẠNG TINH BỘT, DƯỢC PHẨM VÀ BỘ KIT ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ CHẨN ĐOÁN BỆNH THOÁI HÓA DẠNG TINH BỘT BAO GỒM KHÁNG THỂ NÀY**

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể dạng khảm và được làm tương thích với người, các phương pháp và chế phẩm để chẩn đoán và điều trị bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các rối loạn và các dị thường có liên quan đến protein dạng tinh bột như bệnh Alzheimer.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phương pháp và chế phẩm để chẩn đoán và điều trị bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các rối loạn và các dị thường có liên quan đến protein dạng tinh bột như bệnh Alzheimer.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Chứng thoái hoá dạng tinh bột không phải là một thực thể bệnh riêng rẽ mà là một nhóm nhiều loại các quá trình tiến triển bệnh đặc trưng bởi các chất lắng cặn trong mô ngoại bào gồm sáp, protein tương tự tinh bột gọi là dạng tinh bột, tích tụ ở một hoặc nhiều cơ quan hoặc cơ thể. Khi các chất lắng cặn dạng tinh bột tích tụ, chúng bắt đầu gây cản trở chức năng thông thường của các cơ quan hoặc cơ thể. Có ít nhất 15 loại chứng thoái hoá dạng tinh bột. Các dạng chính là thoái hoá dạng tinh bột nguyên phát không có tiền sử đã biết, thoái hoá dạng tinh bột thứ phát tiếp theo một số tình trạng khác và thoái hoá dạng tinh bột di truyền.

Thoái hoá dạng tinh bột thứ phát xuất hiện ở người bị bệnh viêm nhiễm hoặc lây nhiễm mãn tính, như bệnh lao, bệnh nhiễm khuẩn gọi là sốt Mediterranean, các bệnh nhiễm khuẩn xương (viêm xương tuỷ), viêm đa khớp dạng thấp, viêm nhiễm ruột non (viêm hồi tràng u hạt), bệnh Hodgkin và bệnh phong.

Các chất cặn dạng tinh bột bao gồm hợp phần tinh bột P (AP) (ngũ giác), glycoprotein liên quan đến tinh bột bình thường trong huyết thanh P (SAP), và các glycosaminoglycan sulfat hoá (GAG), các cacbohydrat phức hợp của mô liên kết. Các sợi nhỏ protein dạng tinh bột, nó chiếm khoảng 90% chất tinh bột, bao gồm một trong vài loại protein khác nhau. Các protein đó có khả năng gấp nếp

gọi là các sợi tằm "xếp nếp", cấu hình protein duy nhất có các điểm gắn kết cho màu đỏ Congo tạo ra các đặc tính nhuộm độc nhất của protein dạng tinh bột.

Nhiều bệnh do tuổi già dựa vào hoặc có liên quan đến các protein tương tự tinh bột và được đặc trưng phần nào bởi sự tích tụ của các chất lắng cặn ngoại bào chứa protein dạng tinh bột hoặc chất tương tự tinh bột có thể góp phần làm phát sinh bệnh, cũng như sự tiến triển của bệnh. Các bệnh đó bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với chứng thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia. Các bệnh khác dựa vào hoặc liên quan đến các protein tương tự tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng.

Mặc dù sự phát sinh của các bệnh có thể thay đổi khác nhau, nhưng các chất lắng cặn đặc trưng của chúng thường có nhiều phần tử thể phân tử chung. Với mức đáng kể, được cho là do hoạt sự hoạt hoá cục bộ của quá trình tiền viêm do đó dẫn đến xuất hiện sự lắng đọng của các hợp phân bổ sung hoạt hoá, các chất phản ứng giai đoạn cấp tính, các chất điều biến miễn dịch, và các chất môi giới viêm nhiễm khác (McGeer et al., 1994).

Bệnh Alzheimer (AD) là một rối loạn thần kinh về cơ bản được hiểu là do các mảng tinh bột gây nên, sự tích tụ chất lắng cặn bất thường của các protein trong não. Loại tinh bột thường xuyên nhất được thấy trong não của các cá nhân nhiễm bệnh về cơ bản bao gồm các sợi mảnh rất nhỏ A β . Bằng chứng có tính khoa học chứng minh rằng việc gia tăng sự sản sinh và tích tụ của protein dạng tinh bột beta ở các mảng gây chết tế bào thần kinh, nó góp phần vào sự phát triển và tiến triển của AD. Sự tổn hao các tế bào thần kinh ở các vùng não chiến lược, lần lượt, gây giảm các chất dẫn truyền thần kinh và suy giảm trí nhớ. Các protein

chủ yếu gây ra sự tích tụ mảng bao gồm protein tiền chất tinh bột (APP) và hai presenilin (presenilin I và presenilin II). Sự phân giải liên tiếp của protein tiền chất tinh bột (APP), cơ bản được biểu hiện và dị hoá ở hầu hết các tế bào, bằng các enzym β và secretaza γ dẫn đến giải phóng peptit $A\beta$ của axit amin 39 đến 43. Sự suy thoái của các APP có khả năng làm tăng xu hướng kết tụ tại các mảng. Đặc biệt là phần $A\beta(1-42)$ có xu hướng hình thành các khối kết tụ lớn do hai gốc axit amin rất kỵ nước tại đầu tận cùng C của nó. Vì thế phần $A\beta(1-42)$ được cho là có liên quan chủ yếu và gây ra sự khởi đầu của quá trình hình mảng viêm thần kinh ở bệnh AD và vì vậy có khả năng bệnh lý cao. Do đó cần có các tác nhân để ngăn ngừa sự hình thành các mảng tinh bột và khuếch tán các mảng đang tồn tại ở bệnh AD.

Các triệu chứng của bệnh Alzheimer rõ ràng là chậm và triệu chứng đầu tiên có thể chỉ là tính hay quên nhẹ. Ở giai đoạn này, các cá thể có thể quên nhiều sự kiện, hoạt động mới xảy ra, tên của mọi người trong gia đình hoặc mọi thứ và có thể không thể giải quyết được các vấn đề toán học đơn giản. Khi bệnh tiến triển, các triệu chứng dễ dàng để ý hơn và trở nên nghiêm trọng đủ để làm cho người bị bệnh Alzheimer hoặc các thành viên trong gia đình của họ phải cần đến sự giúp đỡ của y học. Các triệu chứng giữa thời kỳ của bệnh Alzheimer bao gồm quên làm các nhiệm vụ đơn giản như thế nào như chải lông ngựa, và các vấn đề tiến triển tới sự nói, hiểu, đọc, hoặc viết. Giai đoạn sau của bệnh Alzheimer, các bệnh nhân có thể trở nên lo âu hoặc hung hăng, có thể đi lang thang ra khỏi nhà và cuối cùng thì cần sự chăm sóc tuyệt đối.

Hiện nay, chỉ có cách xác định để chẩn đoán bệnh Alzheimer là nhận dạng các mảng và các mớ rối trong mô não khi khám nghiệm tử thi sau khi một người chết. Vì vậy, các bác sỹ chỉ thực hiện chẩn đoán về bệnh Alzheimer “có thể” hoặc “có thể xảy ra” khi người bệnh vẫn còn sống. Nhờ sử dụng các phương pháp hiện nay, các bác sỹ có thể chẩn đoán bệnh Alzheimer đúng đến 90 phần trăm so với lần sử dụng một công cụ để chẩn đoán bệnh Alzheimer “có thể xảy

ra”. Các bác sỹ tiến hành các câu hỏi về sức khỏe cá nhân, các vấn đề y học trong quá khứ, và lịch sử của vấn đề khó khăn bất kỳ nào cá nhân gặp khi thực hiện các hoạt động hàng ngày. Các thử nghiệm tập tính về trí nhớ, giải quyết vấn đề, sự chú ý, tổng số đếm được và ngôn ngữ đưa ra thông tin về suy thoái nhận thức và thử nghiệm y học như các thử nghiệm máu, nước tiểu, hoặc dịch tuỷ và scan não có thể cung cấp thêm một số thông tin khác.

Việc quản lý bệnh Alzheimer bao gồm các điều trị dựa vào thuốc và không dựa vào thuốc. Các điều trị giúp thay đổi tiến trình cơ bản của bệnh (làm chậm hoặc đảo ngược tiến trình) cho đến nay phần lớn không thành công. Các loại thuốc phục hồi những thiếu hụt (nhược điểm), hoặc sự trục trặc, trong các chất truyền tin hoá học của các tế bào thần kinh (các chất dẫn truyền thần kinh), đặc biệt là các chất ức chế cholinesteraza (ChEIs) như tacrin và rivastigmin, đã có khả năng cải thiện nhiều triệu chứng. Các ChEI ngăn cản sự thoái hoá enzym của các chất dẫn truyền thần kinh nhờ đó làm tăng lượng các chất truyền tin hoá học có tác dụng truyền các tín hiệu thần kinh ở não.

Đối với một số người ở các giai đoạn sớm và giữa của bệnh, các loại thuốc tacrin (COGNEX[®], Morris Plains, NJ), donepezil (ARICEPT[®], Tokyo, JP), rivastigmin (EXELON[®], East Hanover, NJ), hoặc galantamin (REMINYL[®], New Brunswick, NJ) có thể ngăn ngừa một số triệu chứng không trở nên tồi tệ hơn trong thời gian giới hạn. Dược chất khác, memantin (NAMENDA[®], New York, NY), được chấp thuận để điều trị làm giảm bệnh Alzheimer nghiêm trọng. Ngoài ra, một số loại thuốc có thể giúp kiểm soát các triệu chứng hành vi của bệnh Alzheimer như chứng khó ngủ, bối rối, lơ đãng, lo âu và trầm cảm. Việc điều trị các triệu chứng đó thường làm cho các bệnh nhân cảm thấy thoải mái hơn và làm cho dễ dàng chăm sóc người bệnh hơn. Đáng tiếc, mặc dù việc điều trị được cải tiến hơn đáng kể chứng tỏ rằng loại tác nhân này trong số các tác nhân thích hợp hơn thuốc trấn an, bệnh vẫn tiếp tục tiến triển, và tác dụng trung bình đối với chức năng tinh thần chỉ là vừa phải, ChEIs còn có các tác dụng phụ

bao gồm sự rối loạn chức năng dạ dày-ruột non, đặc tính độc trong gan và giảm cân.

Bệnh khác do hoặc có liên quan đến sự tích tụ hoặc lắng đọng của protein tương tự tinh bột là chứng thoái hoá điểm vàng.

Thoái hoá điểm vàng là bệnh mắt thông thường gây ra sự hư hại điểm, đó là vùng tâm của võng mạc (mô mỏng như giấy ở đằng sau của mắt nơi các tế bào nhạy ánh sáng gửi các tín hiệu thị giác đến não). Khả năng nhìn sắc nét, trong, “thẳng xa về phía trước” được xử lý bằng điểm. Sự tổn thương điểm tạo thành các điểm mù và khả năng nhìn mờ không rõ nét hoặc méo mó. Thoái hoá điểm vàng liên quan đến tuổi tác (AMD) là nguyên nhân chính của sự suy giảm thị giác ở Mỹ và đối với người trên 65 tuổi thì nó là nguyên nhân chính của sự đui mù chính thức ở người Cáp-ca. Khoảng 1,8 triệu người Mỹ 40 tuổi và già hơn bị AMD sớm và 7,3 triệu người khác bị AMD trung gian vào giai đoạn nguy hiểm chính dẫn đến mất khả năng nhìn. Chính phủ dự tính rằng đến 2020 sẽ có 2,9 triệu người bị AMD sớm. Các nạn nhân của AMD thường ngạc nhiên và thất vọng khi phát hiện ra biết quá ít về các nguyên nhân và cách điều trị tình trạng mù này.

Có hai dạng thoái hoá điểm vàng: thoái hoá điểm vàng khô và thoái hoá điểm vàng ướt. Dạng khô, trong đó các tế bào điểm bắt đầu từ từ vỡ, được chẩn đoán là 85 phần trăm các trường hợp thoái hoá điểm vàng. Cả hai mắt thường bị tác động bởi AMD khô, mặc dù một mắt có thể mất khả năng nhìn trong khi mắt kia vẫn không bị ảnh hưởng. Drusen, là các chất lắng cặn màu vàng dưới võng mạc, thường là các dấu hiệu biểu hiện sớm của AMD khô. Nguy cơ phát triển của AMD khô sớm hoặc AMD ướt tăng khi số lượng hoặc kích cỡ của drusen tăng. Đối với AMD khô nó có thể là làm tăng hoặc gây mất thị giác mà không đổi thành dạng ướt của bệnh; tuy nhiên, đối với AMD khô giai đoạn sớm thì có thể thay đổi đột ngột thành dạng ướt.

Dạng ướt, mặc dù chỉ chiếm 15 phần trăm các trường hợp, nhưng làm cho 90 phần trăm bị mù và được coi là AMD sớm (không phải là giai đoạn sớm hoặc trung gian của AMD ướt). AMD ướt thường đến trước dạng khô của bệnh. Khi dạng khô trở nên tệ hơn thì một số người bắt đầu có các mạch máu bất thường lớn lên đằng sau điểm. Các mạch máu này rất yếu và sẽ bị rò chất lỏng và máu (vì thế gọi là thoái hoá điểm vàng ướt), gây tổn thương nhanh chóng điểm.

Dạng khô của AMD sẽ thường bắt đầu làm thị giác bị mờ nhẹ. Đặc biệt tâm của thị giác sau đó trở nên bị mờ và vùng này trở nên lớn hơn khi bệnh tiến triển. Không có các triệu chứng được chú ý nếu chỉ một mắt bị ảnh hưởng. Ở dạng AMD ướt, các đường thẳng có thể xuất hiện gợn sóng và việc mất thị giác tâm có thể xuất hiện nhanh chóng.

Sự chẩn đoán bệnh thoái hoá điểm vàng thường bao gồm việc kiểm tra mắt giãn ra, thử nghiệm độ tinh nhanh của thị giác, và tầm nhìn ngược của mắt nhờ sử dụng phương pháp gọi là soi đáy mắt để giúp chẩn đoán AMD, và nếu AMD ướt được nghi ngờ thì việc chụp tia X mạch florescein cũng có thể được tiến hành. Nếu AMD khô đạt tới các giai đoạn sớm thì không có phương pháp điều trị thông dụng nào để ngăn ngừa mất thị giác. Tuy nhiên, chế phẩm liều cao đặc hiệu chứa các chất chống oxy hoá và kẽm có thể làm chậm trễ hoặc ngăn ngừa AMD trung gian khỏi tiến triển thành giai đoạn sớm. Macugen® (dung dịch tiêm truyền natri pegaptanib), liệu pháp quang động và quang đông tụ laser có thể kiểm soát sự hình thành mạch máu bất thường và sự chảy máu trong điểm, nó có ích với một số người bị AMD ướt; tuy nhiên, thị giác đã mất sẽ không phục hồi được bằng các kỹ thuật này. Nếu thị giác đã mất, các phương tiện trợ giúp thị giác kém tồn tại có thể giúp cải thiện chất lượng cuộc sống.

Một trong các dấu hiệu sớm nhất của thoái hoá điểm vàng liên quan đến tuổi (AMD) là sự tích tụ của các chất lắng cặn ngoại bào đã biết như drusen giữa phiến nền của epitheli tạo màu võng mạc (RPE) và màng Bruch (BM). Các

nghiên cứu mới đây của Anderson et al. đã khẳng định rằng drusen chứa beta dạng tinh bột. (Experimental Eye Research 78 (2004) 243-256).

Nghiên cứu đang triển khai tiếp tục các nghiên cứu thăm dò về các nhân tố môi trường, di truyền và chế độ ăn uống có thể góp phần vào AMD. Các phương pháp điều trị mới cũng được khảo sát, bao gồm cấy ghép tế bào võng mạc, các dược chất sẽ ngăn ngừa hoặc làm chậm lại quá trình tiến triển của bệnh, liệu pháp bức xạ, các liệu pháp gen, chip máy tính cấy vào võng mạc để có thể giúp kích thích thị giác và các tác nhân sẽ ngăn ngừa sự hình thành của các mạch máu mới dưới điểm.

Nhân tố quan trọng để cân nhắc khi triển khai các dược chất mới là dễ sử dụng cho các bệnh nhân đích. Dạng phân phối dược chất qua đường miệng, cụ thể là các viên nén, viên nang và gel mềm, chiếm 70% tất cả các dạng liệu sử dụng vì sự tiện lợi cho bệnh nhân. Các chuyên viên thiết kế thuốc đồng ý rằng các bệnh nhân thích cách sử dụng qua đường miệng hơn sử dụng qua đường tiêm truyền hoặc cách khác, hơn các dạng sử dụng thuốc xâm nhập. Các chế phẩm với các khoảng thời gian liều giải phóng chậm (nghĩa là giải phóng ngày một lần hoặc giải phóng kéo dài) cũng thích hợp. Các kháng thể dễ sử dụng dưới các dạng liệu sử dụng qua đường miệng làm tăng sự ung thuận của bệnh nhân trong quá trình điều trị.

Điều cần thiết là các phương pháp và các chế phẩm hữu hiệu để ngăn chặn và nhằm vào các biến chứng có liên quan đến bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và bệnh thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi như các bệnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia; cũng như các bệnh khác dựa vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ

cứng rải rác; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng. Đặc biệt cái cần thiết là các tác nhân có thể chống lại các triệu chứng sinh lý của bệnh như sự hình thành của các mảng có liên quan đến sự tích tụ của các sợi tinh bột hoặc peptit tương tự tinh bột.

Các kháng thể kháng dạng tinh bột được tạo ra bằng cách tiêm truyền A β ₁₋₄₂ trộn với tá dược hoàn toàn và không hoàn toàn Freund được chứng minh là có khả năng làm giảm lượng tinh bột tích tụ ở chuột chuyển gen cho bệnh Alzheimer ở người (Schenk et al., 1999). Việc tiêm truyền trong bụng A β ₁₋₁₆ tetrapalmitoyl hoá hồi phục trong các liposom cho chuột chuyển gen NORBA tạo ra các độ chuẩn đáng kể của các kháng thể kháng tinh bột, nó cũng chứng minh khả năng có thể làm tan các sợi và các mảng dạng tinh bột *in vitro* và *in vivo* (Nicolau et al., 2002).

Cơ chế thích hợp nhờ đó làm tan các sợi và các mảng dạng tinh bột nảy sinh trước tiên bằng sự đề xuất của Bard et al., (2000), người đã đưa ra kết luận, dựa vào thông số của chúng, rằng các kháng thể opsonin hoá các mảng, sau đó chúng bị phá huỷ bởi các đại thực bào của các vi tế bào thần kinh. De Mattos et al., (2001) cho biết rằng mAb trực tiếp chống lại vùng tâm của tinh bột β có thể gắn kết và cô lập hoàn toàn tinh bột trong plasma. Họ tranh luận rằng sự có mặt của các mAb đó trong quá trình tuần hoàn làm chuyển rời trạng thái cân bằng của A β giữa não và plasma, giúp cho việc làm sạch và dị hoá ngoại biên thay cho lắng đọng trong não.

Liệu pháp điều trị cho người kéo dài bằng kháng thể bộ gặm nhấm có thể tạo ra đáp ứng kháng globulin được phát hiện vào khoảng 8-12 ngày sau khi sử dụng và đạt đến đỉnh vào khoảng 20-30 ngày. Nếu xảy ra đáp ứng kháng globulin, thì việc điều trị phải đình chỉ sau không nhiều hơn 10 ngày và việc điều trị lại vào ngày sau cùng thường được ngăn ngừa vì nó sẽ tạo ra sự tấn công

nhánh của đáp ứng kháng globulin thứ phát. Mặc dù các kháng thể bộ găm nhấm có chung mức độ bảo toàn trình tự lớn với mức độ của các kháng thể người, thì vẫn có nhiều khác biệt trình tự giữa các kháng thể người và kháng thể bộ găm nhấm đủ để các kháng thể bộ găm nhấm tạo miễn dịch ở người.

Vấn đề này có thể khắc phục được bằng cách làm phát sinh các kháng thể trực tiếp ở người hoặc bằng cách tạo ra “sự tương thích với người” (a.k.a. kháng thể "tạo hình lại"). Kháng thể được làm tương thích với người có trình tự axit amin của vùng biến đổi chứa các CDR thu được từ bộ găm nhấm đặt rải rác ở các trình tự khung người hoặc tương tự người. Do tính đặc hiệu của kháng thể được làm tương thích với người được tạo ra bởi các CDR thu được từ bộ găm nhấm, nên các gốc của chúng được sử dụng về cơ bản không thay đổi với chỉ các cải biến nhỏ được cho phép, nó không gây trở ngại đáng kể cho ái lực và tính đặc hiệu của kháng thể cho kháng nguyên đích của nó. Các gốc khung có thể thu được từ vùng biến đổi bất kỳ nào của động vật linh trưởng, hoặc đặc biệt từ vùng biến đổi bất kỳ nào của người hoặc có thể là tổ hợp của chúng và vùng biến đổi thiết kế thu được sẽ được xem xét tạo hình lại.

Để tối đa hoá khả năng rằng ái lực sẽ được duy trì ở kháng thể tạo hình lại là quan trọng để tạo ra sự chọn lọc thích hợp của vùng khung. Đã biết rằng các trình tự khung sử dụng để giữ các CDR theo định hướng không gian chuẩn của chúng để tương tác với kháng nguyên, và rằng các gốc khung đôi khi có thể còn tham gia vào gắn kết kháng nguyên. Để duy trì ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên của nó có lợi nếu chọn lọc các trình tự khung người phần lớn tương tự với các trình tự của các khung bộ găm nhấm. Tiếp theo có thể vẫn cần thiết để thay thế một hoặc nhiều axit amin ở trình tự khung người với gốc tương ứng ở khung bộ găm nhấm để tránh mất ái lực. Sự thay thế này có thể được giúp đỡ bằng cách lập mô hình theo máy tính.

Sáng chế đề xuất các phương pháp và các dược phẩm mới bao gồm các kháng thể đặc hiệu cao và rất có hiệu quả, đặc biệt là các kháng thể dạng khảm

kể cả các phần của chúng, đặc biệt hơn là các kháng thể được làm tương thích với người một phần hoặc hoàn toàn kể cả các phần của chúng, có khả năng nhận dạng và gắn kết đặc hiệu với các epitop đặc hiệu từ các loại kháng nguyên dạng tinh bột β , nó có thể có mặt với kháng thể dưới dạng monome, dime, trime, v.v.. dạng polyme, dưới dạng tổ hợp, các sợi, các sợi mảnh rất nhỏ hoặc dưới dạng ngưng tụ của mảng. Các kháng thể được làm cho có khả năng bằng sự chỉ dẫn của sáng chế được đặc biệt sử dụng để điều trị các bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn do hoặc có liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi tác bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), gồm có các bệnh hoặc tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (dạng Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia; cũng như các bệnh khác căn cứ vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như bệnh liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng, chỉ kể tên một số loại.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm tách biệt, cụ thể là với ít nhất hai điểm tách biệt, và đặc biệt hơn là với ít nhất ba điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó mỗi trong một điểm tách biệt này, ít nhất hai điểm tách biệt này và ít nhất ba điểm tách biệt này bao gồm ít nhất một hoặc hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể.

Đặc biệt, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế gắn kết với ít nhất hai, cụ thể là với ít nhất ba điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó ít nhất hai trong số ba điểm tách biệt bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể và ít nhất một trong ba điểm tách biệt bao gồm ít nhất một gốc axit amin.

Ít nhất hai điểm tách biệt bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể được định vị gần nhau trên kháng nguyên, tách biệt và/hoặc ở bên sườn bằng ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc với một mức nhỏ đáng kể như so với ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp này, vì vậy tạo ra một epitop đứt đoạn cấu hình riêng.

Ít nhất ba điểm tách biệt bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp và ít nhất một gốc axit amin tương ứng, phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể được định vị gần nhau trên epitop, tách biệt và/hoặc ở bên sườn bằng ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc với một mức nhỏ đáng kể như so với các gốc axit amin, phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, vì vậy tạo ra một epitop đứt đoạn cấu hình riêng.

Đặc biệt, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm tách biệt, cụ thể là với ít nhất hai điểm tách biệt, đặc biệt hơn là với ít nhất ba điểm tách biệt protein dạng tinh bột β trong đó trong ít nhất một điểm tách biệt này hoặc ít nhất hai điểm tách biệt này bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp thể hiện điểm gắn kết thứ nhất là -Phe-Phe- gắn vào trong trình tự nhân dưới đây (SEQ ID NO:9):

Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, trong đó

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và Ile;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp,

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ và Xaa₆ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc với một mức nhỏ đáng kể như so với điểm gắn kết -Phe-Phe-.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó

Xaa₃ là Val hoặc Leu, nhưng đặc biệt là Val;

Xaa₄ là Ala hoặc Val, nhưng đặc biệt là Ala;

Xaa₅ là Glu hoặc Asp, nhưng đặc biệt là Glu;

Xaa₆ là Glu hoặc Asp, nhưng đặc biệt là Asp.

Đặc biệt, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm tách biệt, cụ thể là với ít nhất hai điểm tách biệt, đặc biệt hơn là với ít nhất ba điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó các điểm tách biệt này bao gồm ít nhất một và ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp tương ứng, phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp thể hiện điểm gắn kết thứ nhất là -Phe-Phe- và ít nhất một gốc axit amin là -His- gắn vào trong trình tự nhân dưới đây:

- Xaa₁ - His - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Phe - Phe - Xaa₇ - Xaa₈ - Xaa₉-,

trong đó

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln, Lys và Arg

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln, Lys và Arg

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₆ là gốc được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile

Xaa₇ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu và Ile

Xaa₈ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp,

Xaa₉ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₁, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₇, Xaa₈ và Xaa₉ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc tới một mức nhỏ đến mức nhỏ hơn rất đáng kể như so với điểm gắn kết -His- và the -Phe-Phe- tương ứng.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó

Xaa₃ là Gln hoặc Asn, nhưng đặc biệt là Gln;

Xaa₄ là Lys;

Xaa₅ là Leu;

Xaa₆ là Val hoặc Leu, nhưng đặc biệt là Val;

Xaa₇ là Ala hoặc Val, nhưng đặc biệt là Ala;

Xaa₈ là Glu hoặc Asp, nhưng đặc biệt là Glu; và

Xaa₉ là Asp hoặc Glu, nhưng đặc biệt là Asp.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm tách biệt, cụ thể là với ít nhất hai điểm tách biệt, đặc biệt hơn là với ít nhất ba điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β , trong đó trong ít nhất một điểm tách biệt này hoặc ít nhất hai điểm tách biệt này bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp thể hiện thể hiện giảm gắn kết thứ hai là -Lys-Leu- gắn vào trong trình tự nhân dưới đây (SEQ ID NO:10):

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ trong đó

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln Lys và Arg;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và He; và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂; Xaa₃ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc tới một mức nhỏ đến mức nhỏ hơn rất đáng kể như so với điểm gắn kết -Lys-Leu-.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm tách biệt, cụ thể là với ít nhất hai điểm tách biệt, đặc biệt hơn là với ít nhất ba điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó các điểm tách biệt này bao gồm ít nhất một và ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp tương ứng, phần lớn liên quan đến

gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất một và ít nhất hai axit amin liên tiếp, được tách bằng ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc với một mức nhỏ đáng kể như so với các gốc axit amin phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, là -His- và -Lys-Leu- tương ứng, được gắn vào trong trình tự nhân dưới đây:

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆ - Xaa₇ - Xaa₈ — trong đó

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và Ile;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và Ile;

Xaa₅ là gốc được chọn từ nhóm bao gồm có Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và Ile;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₇ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp,

Xaa₈ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₆, Xaa₇ và Xaa₈ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc tới một mức nhỏ đến mức nhỏ hơn rất đáng kể như so với điểm gắn kết -His- và -Lys-Leu- tương ứng.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khả hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó

Xaa₂ là Gln hoặc Asn, nhưng đặc biệt là Gln;

Xaa₃ là Val hoặc Leu, nhưng đặc biệt là Val;

Xaa₄ là Phe;

Xaa₅ là Phe;

Xaa₆ là Ala hoặc Val, nhưng đặc biệt là Ala;

Xaa₇ là Glu hoặc Asp, nhưng đặc biệt là Glu; và

Xaa₈ là Asp hoặc Glu, nhưng đặc biệt là Asp.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất hai điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó trong ít nhất hai điểm tách biệt này bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất hai axit amin liên tiếp được tách bởi ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc với một mức nhỏ hơn đáng kể so với các gốc axit amin liên tiếp, là -Phe-Phe- và -Lys-Leu- tương ứng, thể hiện điểm gắn kết thứ nhất và thứ hai gắn vào trong trình tự nhân dưới đây:

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, trong đó

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln Lys và Arg;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và He;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp,

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ và Xaa₆ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc tới một mức nhỏ đến mức nhỏ hơn rất đáng kể như so với điểm gắn kết -Lys-Leu- và -Phe-Phe- tương ứng.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm tách biệt, cụ thể là với ít nhất hai điểm tách biệt, đặc biệt hơn là với ít nhất ba điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó các điểm tách biệt này bao gồm ít nhất một và ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp tương ứng, phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất một và ít nhất hai axit amin liên tiếp được tách bằng ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc với một mức nhỏ đáng kể như so với các gốc axit amin, phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, và trong đó các gốc axit amin này là -His- và -Phe-Phe- và -Lys-Leu- tương ứng, gắn vào trong trình tự nhân dưới đây:

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, trong đó

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và Ile;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp,

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ và Xaa₆ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc tới một mức nhỏ đến mức nhỏ hơn rất đáng kể như so với điểm gắn kết -His-, -Lys-Leu- và -Phe-Phe- tương ứng.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó

Xaa₂ là Gln hoặc Asn, nhưng đặc biệt là Gln;

Xaa₃ là Val hoặc Leu, nhưng đặc biệt là Val;

Xaa₄ là Ala hoặc Val, nhưng đặc biệt là Ala;

Xaa₅ là Glu hoặc Asp, nhưng đặc biệt là Glu; và

Xaa₆ là Asp hoặc Glu, nhưng đặc biệt là Asp.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất hai điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó ít nhất hai điểm tách biệt này bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó ít nhất hai axit amin liên tiếp được tách bằng ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc với một mức nhỏ hơn đáng kể so với gốc axit amin liên tiếp này, là -Phe-Phe- và -Lys-Leu- tương ứng, thể hiện điểm gắn kết thứ nhất và thứ hai gắn vào trong trình tự nhân dưới đây:

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, trong đó

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln, Lys và Arg;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Val, Ala, Leu, Met, Phe, norleuxin và Ile

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu và Ile;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp,

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ và Xaa₆ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc tới một mức nhỏ đến mức nhỏ hơn rất đáng kể như so với điểm gắn kết -Lys-Leu- và -Phe-Phe- tương ứng.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó

Xaa₁ là His hoặc Arg, nhưng đặc biệt là His;

Xaa₂ là Gln hoặc Asn, nhưng đặc biệt là Gln;

Xaa₃ là Val hoặc Leu, nhưng đặc biệt là Val;

Xaa₄ là Ala hoặc Val, nhưng đặc biệt là Ala;

Xaa₅ là Glu hoặc Asp, nhưng đặc biệt là Glu; và

Xaa₆ là Asp hoặc Glu, nhưng đặc biệt là Asp.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất hai điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β , trong đó ít nhất hai điểm tách biệt này bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, là - Phe - Phe - Ala - Glu -, cụ thể là - Phe - Phe - Ala -, nhưng đặc biệt là - Phe - Phe - và - Lys - Leu - tương ứng, và trong đó ít nhất hai điểm tách biệt này có trình tự axit amin - Val - Phe - Phe - Ala - Glu - Asp - thể hiện trong SEQ ID NO:7 và trình tự axit amin - His - Gln - Lys - Leu - Val - thể hiện trong SEQ ID NO: 8 tương ứng.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất một điểm tách biệt, cụ thể là với ít nhất hai điểm tách biệt, đặc biệt hơn là với ít nhất ba điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó ít nhất một điểm tách biệt này hoặc ít nhất hai điểm tách biệt này bao gồm ít nhất một và ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp tương ứng, phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, là -Phe-Phe- và -Lys-Leu-, và -His- tương ứng, trong đó các điểm tách biệt này gắn vào trình tự axit amin - Val - Phe - Phe - Ala - Glu-, và trình tự axit amin - His - Gln - Lys - Leu - Val - tương ứng.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng bao gồm một nhận dạng kháng nguyên và điểm gắn kết có thể nhận dạng và gắn kết với ít nhất hai điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó ít nhất hai điểm tách biệt này bao gồm ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp trong trình tự axit amin đã cho trong SEQ ID NO : 7 và 8, tương ứng, trong đó gốc axit amin liên tiếp này, cụ thể là -Phe- Phe- và -Lys-Leu-, phần lớn liên quan đến gắn kết của protein dạng tinh bột β .

Theo một phương án đặc biệt nữa của sáng chế, kháng thể hoặc một phần của chúng theo sáng chế được đề xuất, gắn kết với 4 điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β trong đó 4 điểm tách biệt này bao gồm 2 điểm gắn kết trong đó mỗi điểm bao gồm một gốc axit amin và 2 điểm gắn kết bao gồm hai gốc axit amin liên tiếp, các gốc đó phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể, trong đó 4 điểm tách biệt này được định vị gần nhau trên protein dạng tinh bột β , và trong đó 4 điểm gắn kết này được tách bằng ít nhất một gốc axit amin không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc có liên quan nhưng với mức nhỏ hơn đáng kể như so với một gốc axit amin này và hai gốc axit amin liên tiếp này của 4 điểm tách biệt vì vậy tạo ra một epitop đứt đoạn cấu hình riêng.

Đặc biệt, gốc thứ nhất trong số hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể là -Lys-Leu-, và gốc thứ hai trong số ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp là -Phe-Phe-, gốc thứ nhất trong số các gốc axit amin đơn là -His- và gốc thứ hai trong số các gốc axit amin đơn là -Asp- gắn vào trong trình tự nhân dưới đây:

- Xaa₁ - His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Asp - Xaa₆

trong đó

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln, Lys và Arg, nhưng đặc biệt là His;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln, nhưng đặc biệt là Gln;

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe, và lie, cụ thể là Val;

Xaa₄ là axit amin gốc được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và lie, cụ thể là Ala;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, cụ thể là Glu;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và lie, cụ thể là Val; và trong đó các gốc axit amin này Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ và Xaa₆ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc liên quan đến gắn kết nhưng với một mức nhỏ hơn đáng kể như so với điểm gắn kết -His-, -Asp-, -Lys-Leu- và -Phe-Phe-.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể hoặc một phần của chúng theo sáng chế, gắn kết với 4 điểm tách biệt trên protein dạng tinh bột β ,

trong đó 4 điểm tách biệt này bao gồm hai điểm gắn kết trong đó mỗi điểm bao gồm một gốc axit amin và hai điểm gắn kết trong đó mỗi điểm bao gồm hai gốc axit amin liên tiếp, trong đó gốc thứ nhất trong hai gốc axit amin liên tiếp phần lớn liên quan đến gắn kết của kháng thể là -Lys-Leu-, và gốc thứ hai trong ít nhất hai gốc axit amin liên tiếp là -Phe-Phe-, gốc thứ nhất trong số các gốc axit amin đơn là -His- và gốc thứ hai trong số các gốc axit amin đơn là -Asp- gắn vào trong trình tự nhân dưới đây:

- Xaa₁ - His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Asp - Xaa₆

trong đó

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn, Gln, Lys và Arg, nhưng đặc biệt là His;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm gồm có Asn và Gln, nhưng đặc biệt là Gln ;

Xaa₃ là gốc được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và Ile, cụ thể là Val;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile, cụ thể là Ala;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, cụ thể là Glu;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, norleuxin, Met, Phe và Ile, cụ thể là Val; và trong đó các gốc axit amin này Xaa₁, Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ và Xaa₆ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc liên quan đến gắn kết nhưng với một mức nhỏ hơn đáng kể như so với điểm gắn kết -His-, -Asp-, -Lys-Leu- và -Phe-Phe-.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, các điểm nhận dạng và điểm gắn kết như được xác định ở trên tạo ra một epitop đứt quãng cấu hình riêng định vị ở vùng của protein dạng tinh bột β giữa gốc axit amin từ 12 đến 24, cụ thể là giữa các gốc từ 14 đến 23, đặc biệt hơn là giữa các gốc axit amin 14 và 20, trong đó ít nhất hai điểm nhận dạng và gắn kết tách biệt bao gồm ít nhất 2 gốc axit amin, được định vị tại vị trí 16 và 17 và tại vị trí 19 và 20 tương ứng, và trong đó ít nhất một điểm nhận dạng và gắn kết tách biệt bao gồm ít nhất 1 gốc axit amin được định vị tại vị trí 14, các gốc đó phần lớn liên quan đến gắn kết của protein dạng tinh bột β và trong đó điểm nhận dạng và gắn kết tách biệt này là ít nhất trên một cạnh ở bên sườn bởi các gốc axit amin, cụ thể là các gốc 21 và 22, và tách biệt bởi một gốc axit amin định vị tại vị trí 15 và 18, các gốc axit amin đó không liên quan trực tiếp đến gắn kết của kháng nguyên hoặc, ít nhất, tới một mức nhỏ hơn đáng kể.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế ít nhất ba điểm nhận dạng và gắn kết tách biệt này ở bên sườn trên cả hai cạnh bởi các gốc axit amin, cụ thể là các gốc 12 và 13, và các gốc 21 và 22 và được tách bởi một gốc axit amin định vị tại vị trí 15 và 18, các gốc axit amin đó không liên quan trực tiếp đến gắn kết của kháng nguyên hoặc, ít nhất tới một mức nhỏ hơn đáng kể.

Theo một phương án đặc biệt, gốc axit amin liên tiếp này, cụ thể là -Lys-Leu- tại vị trí 16 và 17 và -Phe-Phe- tại vị trí 19 và 20, phần lớn liên quan đến gắn kết của protein dạng tinh bột β , gắn vào vùng nhân dưới đây:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23

Theo một phương án đặc biệt khác, các gốc axit amin này, cụ thể là -Lys-Leu- tại vị trí 16 và 17 và -Phe-Phe- tại vị trí 19 và 20, và -His- tại vị trí 14, phần lớn liên quan đến gắn kết của protein dạng tinh bột β , được gắn vào vùng nhân dưới đây:

Val-	His-	His-	Gln-	Lys-	Leu-	Val-	Phe-	Phe-	Ala-	Glu-	Asp
12	13	14	15	16	17	18	19	20	21	22	23
Val-	Gly-										
24	25										

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng, ít nhất một CDR có nguồn gốc không phải người, đặc biệt là hai CDR có nguồn gốc không phải người, đặc biệt hơn là ba CDR có nguồn gốc không phải người, gắn vào một hoặc nhiều vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng và, tùy ý, vùng ổn định thu được từ kháng thể có nguồn gốc người hoặc động vật linh trưởng, kháng thể đó được làm tương thích với người hoặc phần của chúng có khả năng nhận dạng và gắn kết đặc hiệu với protein dạng tinh bột β , đặc biệt là peptit đơn phân tinh bột β , đặc biệt hơn là peptit dạng tinh bột đa phân β , thậm chí đặc biệt hơn là các sợi, các sợi mảnh rất nhỏ, các sợi tơ β phân lập hoặc như là một phần của mảng dạng tinh bột β , tại epitop bao gồm trình tự axit amin dưới đây (SEQ ID NO:11):

Xaa₁ - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, trong đó

Xaa₁ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm His, Asn và Gln, nhưng đặc biệt là His;

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln, nhưng đặc biệt là Gln; và

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Val, Leu và Ile, nhưng đặc biệt là Val;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala và Val, nhưng đặc biệt là Ala;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, nhưng đặc biệt là Glu;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, nhưng đặc biệt là Asp.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất bao gồm ở vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tương ứng, ít nhất một CDR có nguồn gốc không phải người, đặc biệt là hai CDR có nguồn gốc không phải người, đặc biệt hơn là ba CDR có nguồn gốc không phải người, gắn vào một hoặc nhiều vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng và, tùy ý, vùng ổn định thu được từ kháng thể có nguồn gốc người hoặc động vật linh trưởng, kháng thể đó được làm tương thích với người hoặc phần của chúng có khả năng nhận dạng và gắn kết đặc hiệu với protein dạng tinh bột β , đặc biệt là peptit đơn phân dạng tinh bột β , đặc biệt hơn là peptit dạng tinh bột đa phân β , thậm chí đặc biệt hơn là các sợi, các sợi mảnh rất nhỏ, các sợi tơ β phân lập hoặc như là một phần của mảng dạng tinh bột β , tại epitop bao gồm trình tự axit amin dưới đây:

His - Xaa₂ - Lys - Leu - Xaa₃ - Phe - Phe - Xaa₄ - Xaa₅ - Xaa₆, trong đó

Xaa₂ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn và Gln, nhưng đặc biệt là Gln; và

Xaa₃ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Val, Leu, và Ile, nhưng đặc biệt là Val;

Xaa₄ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala và Val, nhưng đặc biệt là Ala;

Xaa₅ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, nhưng đặc biệt là Glu;

Xaa₆ là gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Glu và Asp, nhưng đặc biệt là Glu; và trong đó các gốc axit amin này Xaa₂, Xaa₃, Xaa₄, Xaa₅ và Xaa₆ không liên quan đến gắn kết kháng thể hoặc tới một mức nhỏ hơn đáng kể như so với điểm gắn kết -His- và -Lys-Leu- và -Phe-Phe-.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, CDR có nguồn gốc không phải người thu được từ kháng thể cho, nhưng đặc biệt là kháng thể chuột cho, tăng lên chống lại phần kháng nguyên không chứa điểm tách biệt này. Gây ra chuyển đổi này ở vùng epitop có thể ít nhất một phần là do việc sử dụng cấu trúc kháng nguyên trên phân tử bao gồm một peptit kháng nguyên tương ứng với trình tự axit amin của peptit tinh bột β , đặc biệt là peptit tinh bột β A β ₁₋₁₆, được cải biến bằng gốc ưa nước như, ví dụ polyetylen glycol (PEG), trong đó gốc ưa nước này là liên kết cộng hoá trị với mỗi đầu tận cùng của peptit kháng nguyên bằng ít nhất một, đặc biệt là một hoặc hai axit amin như, ví dụ lysin, axit glutamic và xystein hoặc axit amin thích hợp bất kỳ nào khác hoặc chất tương tự axit amin có thể sử dụng như dụng cụ nối để kết hợp gốc ưa nước với phần peptit, như được mô tả dưới đây trong quy trình tạo miễn dịch. Khi PEG được sử dụng làm gốc ưa nước, đầu tận cùng PEG tự do là liên kết cộng hoá trị với phosphatidyletanolamin hoặc hợp chất bất kỳ nào khác thích hợp để hoạt động như thành phần neo, ví dụ để gắn vào cấu trúc kháng nguyên trong lớp kép của liposom như được mô tả ở đây.

Đặc biệt, CDR có nguồn gốc không phải người thu được từ kháng thể chuột cho có các đặc tính đặc trưng của ACI-01-Ab7C2 (còn được gọi là "mC2" trong toàn bộ sáng chế) được nộp lưu vào ngày 01 tháng 12 năm 2005 tại cơ quan lưu giữ "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ở Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest với số hiệu lưu giữ DSM ACC2750).

Theo một phương án của sáng chế, CDR có nguồn gốc không phải người thu được từ kháng thể chuột cho ACI-01-Ab7C2 (còn được gọi là "mC2" trong

toàn bộ sáng chế) được nộp lưu vào ngày 01 tháng 12 năm 2005 tại cơ quan lưu giữ "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ở Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest với số hiệu lưu giữ DSM ACC2750).

Cũng sử dụng lipit A như một phần của phương pháp tạo miễn dịch có thể góp phần vào sự chuyển rời ở vùng epitop.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng bao gồm chèn vào vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất một peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự bao gồm SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, trong đó kháng thể được làm tương thích với người này bao gồm hoà nhập vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất một peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự gồm có SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, trong đó kháng thể được làm tương thích với người này bao gồm chèn vào các vùng khung biến đổi chuỗi nhẹ thu được từ người hoặc động vật linh trưởng một peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO : 4 thể hiện CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) bao gồm chèn vào vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất một peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) bao gồm chèn vào vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất một peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự gồm có SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Sáng chế còn đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, bao gồm hoà nhập vào vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit, các peptit đó là khác nhau và thể hiện trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự bao gồm SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) trong đó CDR tương tự không thể có mặt hai lần trong kháng thể. Đặc biệt, nếu ít nhất hai CDR có mặt là cả hai CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), thì ít nhất trên các CDR này phải là CDR1 được thể hiện bởi SEQ ID NO:4.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng bao gồm hoà nhập vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự gồm có SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), nhưng đặc biệt là kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng trong đó CDR tương tự không thể có mặt hai lần trong kháng thể.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự

bao gồm SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, bao gồm hoà nhập vào các vùng khung biến đổi chuỗi nhẹ thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự bao gồm SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), có thể chèn vào các vùng khung biến đổi chuỗi nhẹ thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự bao gồm SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), trong đó CDR tương tự không thể có mặt hai lần trong kháng thể và, đặc biệt, ít nhất trên các CDR này phải là CDR1 được thể hiện bởi SEQ ID NO:4.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng các peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), cụ thể theo thứ tự biểu thị nêu trên.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng các peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), cụ thể theo thứ tự biểu thị nêu trên.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng bao gồm chèn vào các vùng khung biến đổi chuỗi nhẹ thu được từ người hoặc động vật linh trưởng các peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), cụ thể theo thứ tự biểu thị nêu trên.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) bao gồm chèn vào các vùng khung biến đổi chuỗi nhẹ thu được từ người hoặc động vật linh trưởng các peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), cụ thể theo thứ tự biểu thị nêu trên.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, bao gồm chèn vào vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất ba peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự bao gồm SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), nhưng đặc biệt là kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng trong đó CDR tương tự không thể có mặt hai lần trong kháng thể.

Theo một phương án khác sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, kháng thể đó bao gồm chèn vào vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất bốn peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự bao gồm SEQ ID NO: 1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), nhưng đặc biệt là kháng thể được làm tương thích với người hoặc một

phần của chúng trong đó CDR tương tự không thể có mặt hai lần trong kháng thể.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, bao gồm chèn vào vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất năm peptit với trình tự axit amin được chọn từ nhóm của các trình tự bao gồm SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR), nhưng đặc biệt là kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng trong đó CDR tương tự không thể có mặt hai lần trong kháng thể.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, bao gồm chèn vào vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng các peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1, SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR), hoặc một phần của chúng, trong đó kháng thể được làm tương thích với người này, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc phần của chúng bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ động vật linh trưởng hoặc người ít nhất một peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc một phần của chúng, trong đó kháng thể được làm tương thích với người này, vùng biến đổi

chuỗi nặng (HCVR) hoặc phần của chúng bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ động vật linh trưởng hoặc người ít nhất một peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc một phần của chúng, kháng thể đó, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc phần của chúng bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1 và SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc một phần của chúng, kháng thể đó, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc phần của chúng bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc một phần của chúng, kháng thể đó, vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) hoặc phần của chúng bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 và SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) hoặc một phần của chúng, kháng thể đó, vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) hoặc phần của chúng bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1 và SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Theo một phương án đặc biệt khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) hoặc một phần của chúng, kháng thể đó, vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) hoặc phần của chúng bao gồm chèn vào các vùng khung chuỗi nặng thu được từ người hoặc động vật linh trưởng ít nhất hai peptit với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1 và SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Sáng chế còn bao gồm kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, trong đó mỗi trong cả vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) và vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) của kháng thể chuột nhất C2 đóng góp ít nhất một trong các vùng CDR của nó vào ít nhất hai vùng CDR của kháng thể được làm tương thích với người. Vì vậy, kháng thể được làm tương thích với người thu được hoặc một phần của chúng có thể bao gồm:

- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1 (LCVR);
- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1 (LCVR);
- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO:4 thể hiện CDR1 (LCVR);
- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 (LCVR);
- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 (LCVR);
- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:2 thể hiện CDR2 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 6 thể hiện CDR3 (LCVR);
- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:1 thể hiện CDR1 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 (LCVR);

- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO:5 thể hiện CDR2 (LCVR); và

- ít nhất một trình tự axit amin của SEQ ID NO:3 thể hiện CDR3 (HCVR) kết hợp với trình tự axit amin của SEQ ID NO:6 thể hiện CDR3 (LCVR).

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng như được mô tả ở đây trên đây, kháng thể đó bao gồm vùng ổn định chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ có nguồn gốc người hoặc động vật linh trưởng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, trong đó ít nhất một, cụ thể là ít nhất một nhưng không nhiều hơn 5, đặc biệt hơn là ít nhất một nhưng không nhiều hơn 4, thậm chí đặc biệt hơn là ít nhất một nhưng không nhiều hơn 3, nhưng đặc biệt là ít nhất một nhưng không nhiều hơn 2, trong số các axit amin đại diện của các vùng CDR chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng như đã nêu trong các trình tự từ SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:6 được thay đổi nhờ sự thay thế bảo toàn sao cho kháng thể duy trì được độ chức đầy đủ của nó.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, trong đó ở CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) như đã nêu trong SEQ ID NO:5, Lys tại vị trí Kabat 50 được thay thế bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Arg, Gln và Glu, cụ thể là bằng Arg.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) trong đó ở CDR2 như đã nêu trong SEQ ID NO:5, Lys tại vị trí Kabat 50 được thay thế bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Arg, Gln và Glu, cụ thể là bằng Arg.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng, trong đó ở CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) như đã nêu trong SEQ ID NO:5, Ser tại vị trí Kabat 53 được thay thế bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn hoặc Thr, nhưng đặc biệt là bằng Asn.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) trong đó ở CDR2 như đã nêu trong SEQ ID NO:5, Ser tại vị trí Kabat 53 được thay thế bằng gốc axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Asn hoặc Thr, nhưng đặc biệt là bằng Asn.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin tương đồng 90%, đặc biệt là 95%, đặc biệt hơn là 98% với trình tự đã cho trong các trình tự SEQ ID NO:15 và SEQ ID NO:16, tương ứng.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin tương đồng 90%, đặc biệt là 95%, đặc biệt hơn là 98% với trình tự đã cho trong các trình tự SEQ ID NO:12 và SEQ ID NO:13, tương ứng.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó ít nhất hai, nhưng đặc biệt là ba của các vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin tương đồng 90%, đặc biệt là 95%, đặc biệt hơn là 98% với vùng CDR tương ứng như đã nêu trong các trình tự từ SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:3.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất, trong đó ít nhất hai, nhưng đặc

biệt là ba của các vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin tương đồng 90%, đặc biệt là 95%, đặc biệt hơn là 98% với vùng CDR tương ứng như đã nêu trong các trình tự từ SEQ ID NO:4 đến SEQ ID NO:6.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế như được mô tả trên đây, trong đó vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin tương đồng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự đã cho trong các trình tự SEQ ID NO:15 và SEQ ID NO:16, tương ứng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế như được mô tả trên đây, trong đó vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin tương đồng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự đã cho trong các trình tự SEQ ID NO:12 và SEQ ID NO:13, tương ứng.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế như được mô tả trên đây, trong đó ít nhất một, cụ thể là ít nhất hai, nhưng đặc biệt là ba của các vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) có trình tự axit amin đồng nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với vùng CDR tương ứng như đã nêu trong các trình tự từ SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:3.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế như được mô tả trên đây, trong đó ít nhất một, cụ thể là ít nhất hai, nhưng đặc biệt là ba của các vùng CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) có trình tự axit amin tương đồng 90%, 91%, 92%, 93%, 94%,

95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với vùng CDR tương ứng như đã nêu trong các trình tự từ SEQ ID NO:4 đến SEQ ID NO:6.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế và như được mô tả trên đây, trong đó ít nhất một trong số các axit amin đại diện của các trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H và V_K tương ứng được thay đổi nhờ sự thay thế thành axit amin từ vùng tương thích của kháng thể chuột ACI-01 -Ab7C2 hoặc ngoài ra là sự thay thế bảo toàn.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Trp ở vị trí Kabat 47 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Leu, norleuxin, He, Val, Met, Ala và Phe, đặc biệt là Leu và Ile, nhưng đặc biệt là Leu như thể hiện trong SEQ ID NO:15.

Sáng chế còn đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Arg ở vị trí Kabat 94 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ser và Thr, nhưng đặc biệt bằng Ser như thể hiện trong SEQ ID NO:15.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Trp ở vị trí Kabat 47 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Leu, norleuxin, He, Val, Met, Ala và Phe, đặc biệt là Leu và Ile, nhưng đặc biệt là

Leu và Arg ở vị trí Kabat 94 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ser và Thr, nhưng đặc biệt bằng Ser như thể hiện trong SEQ ID NO:15.

Sáng chế còn đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương ứng, trong đó Gln ở vị trí Kabat 45 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_K của nhóm phụ KABAT V_{KII} của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Lys, Arg, Gln và Asn, cụ thể bằng Lys và Arg, nhưng đặc biệt bằng Lys.

Sáng chế còn đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ, tương ứng, trong đó Tyr ở vị trí Kabat 87 ở trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_K của nhóm phụ KABAT V_{KII} của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Phe, Leu, Val, Ile và Ala, cụ thể bằng Leu và Phe, nhưng đặc biệt bằng Phe.

Sáng chế còn đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ tương ứng, trong đó Lys ở vị trí Kabat 50 ở vùng CDR2 thu được từ kháng thể đơn dòng chuột nhất, cụ thể là kháng thể chuột ACI-01-Ab7C2, như thể hiện trong SEQ ID NO:12 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Arg, Gln, His và Asn, nhưng đặc biệt là bằng Arg

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ, tương ứng, trong đó Asn ở vị trí Kabat 53 ở vùng CDR2 thu được từ kháng thể đơn dòng chuột nhất, cụ thể là kháng thể chuột ACI-01-Ab7C2, như thể hiện trong SEQ ID NO:12 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và Ile; nhưng đặc biệt là Ser.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người, trong đó Trp ở vị trí Kabat 47 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Leu, norleuxin, Ile, Val, Met, Ala và Phe, cụ thể là Leu và Ile, nhưng đặc biệt là Leu và Arg ở vị trí Kabat 94 ở trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ser và Thr, nhưng đặc biệt bằng Ser như thể hiện trong SEQ ID NO:15, và Tyr ở vị trí Kabat 87 ở trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_K của nhóm phụ KABAT V_{KII} của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Phe, Leu, Val, Ile và Ala, cụ thể bằng Leu và Phe, nhưng đặc biệt bằng Phe.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Trp ở vị trí Kabat 47 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng như thể hiện trong SEQ ID NO:15 được thay thế bằng Leu.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Arg ở vị trí Kabat 94 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng Ser như thể hiện trong SEQ ID NO:15.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và tối kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Tip ở vị trí Kabat 47 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng Leu và Ile, nhưng đặc biệt là Leu và Arg

ở vị trí Kabat 94 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng Ser như thể hiện trong SEQ ID NO:15.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Tyr ở vị trí Kabat 87 ở trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người V_K của nhóm phụ KABAT V_{KII} của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng Phe.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Trp ở vị trí Kabat 47 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng Leu và Ile, nhưng đặc biệt là Leu và Arg ở vị trí Kabat 94 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng Ser như thể hiện trong SEQ ID NO:15 và Tyr ở vị trí Kabat 87 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_K của nhóm phụ KABAT V_{KII} của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được thay thế bằng Phe.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Trp ở vị trí Kabat 47 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm có Leu, norleuxin, Ile, Val, Met, Ala và Phe, cụ thể là Leu và Ile, nhưng đặc biệt là Leu và Arg ở vị trí Kabat 94 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ser và Thr, nhưng đặc biệt bằng Ser như thể hiện trong SEQ ID NO: 15 và trong đó Lys ở vị trí Kabat 50 trong vùng CDR2 thu được từ kháng thể đơn dòng chuột nhất,

cụ thể là kháng thể chuột ACI-01-Ab7C2, được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Arg, Gln, His và Asn, nhưng đặc biệt là bằng Arg.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng và kháng thể được làm tương thích với người bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng này tương ứng, trong đó Trp ở vị trí Kabat 47 trong trình tự khung nhận thu được từ các trình tự người germline V_H của nhóm phụ KABAT V_{HIII} của vùng biến đổi chuỗi nặng được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Leu, norleuxin, He, Val, Met, Ala và Phe, cụ thể là Leu và Ile, nhưng đặc biệt là Leu và Arg ở vị trí Kabat 94 được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ser và Thr, nhưng đặc biệt bằng Ser như thể hiện trong SEQ ID NO:15 và trong đó Asn ở vị trí Kabat 53 trong vùng CDR2 thu được từ kháng thể đơn dòng chuột nhất, cụ thể là kháng thể chuột ACI-O 1-Ab7C2, được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm bao gồm Ala, Val, Leu, Ser và He; nhưng đặc biệt là Ser.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:12.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:12.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm các trình tự tín hiệu như thể hiện trong SEQ ID NO:13.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất, bao gồm vùng biến đổi nhẹ hoàn toàn bao gồm các trình tự tín hiệu như thể hiện trong SEQ ID NO:13.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:12 và vùng ổn định chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:14.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất, bao gồm vùng biến đổi nhẹ hoàn toàn của SEQ ID NO:13 và vùng ổn định chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:14.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:15.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:15.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất vùng biến đổi chuỗi nặng bao gồm các trình tự tín hiệu như thể hiện trong SEQ ID NO:16.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất, bao gồm vùng biến đổi nặng hoàn toàn bao gồm các trình tự tín hiệu như thể hiện trong SEQ ID NO:16.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:15 và vùng ổn định chuỗi nặng của SEQ ID NO:17.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người được đề xuất, bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:16 và vùng ổn định chuỗi nặng của SEQ ID NO:17.

Theo một phương án, kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế và như được mô tả ở đây, khi cùng ủ với peptit đơn phân $A\beta$ có ít nhất 30, đặc biệt là ít nhất 35, đặc biệt hơn là ít nhất 38, thậm chí đặc biệt hơn là ít nhất 40 các gốc axit amin và/hoặc peptit tinh bột đa phân tan được bao gồm phần lớn các đơn vị đơn phân $A\beta$, nhưng đặc biệt là với peptit tinh bột đơn phân $A\beta_{1-42}$ và/hoặc đa phân tan được $A\beta$ bao gồm phần lớn các đơn vị đơn phân $A\beta_{1-42}$, cụ thể là với tỷ lệ nồng độ mol của kháng thể với $A\beta_{1-42}$ tới 1:1000, cụ thể là đến

1:500, đặc biệt hơn là đến 1:300, thậm chí đặc biệt hơn là đến 1:200, nhưng đặc biệt là với tỷ lệ nồng độ mol khoảng 1:10 và 1:100, ức chế sự kết tụ của các chất đơn phân $A\beta$ với các sợi đa phân mảnh rất nhỏ phân tử cao.

Đặc biệt, quá trình cùng ủ kháng thể theo sáng chế với các peptit dạng tinh bột đa phân tan được và/hoặc các peptit dạng tinh bột đơn phân được tiến hành trong 24 giờ đến 60 giờ, đặc biệt là 30 giờ đến 50 giờ, đặc biệt hơn là trong 48 giờ, nhưng đặc biệt là 24 giờ, ở nhiệt độ khoảng 28°C và 40°C, đặc biệt là khoảng 32°C và 38°C, đặc biệt hơn là ở 37°C.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, quá trình cùng ủ kháng thể theo sáng chế với các peptit dạng tinh bột đa phân tan được và/hoặc các peptit dạng tinh bột đơn phân được tiến hành trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Đặc biệt, kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng gắn kết với peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ và/hoặc peptit tinh bột đa phân tan được $A\beta$ bao gồm phần lớn các đơn vị đơn phân $A\beta_{1-42}$ này và, khi cùng ủ với peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$ và/hoặc peptit tinh bột đa phân tan được $A\beta$ bao gồm phần lớn các đơn vị đơn phân $A\beta_{1-42}$ ức chế sự kết tụ của các chất đơn phân $A\beta$ và/hoặc đa phân với các sợi đa phân mảnh rất nhỏ phân tử cao.

Theo một phương án, kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng ức chế sự kết tụ của các chất đơn phân $A\beta$ và/hoặc các chất đa phân tan được $A\beta$ bao gồm phần lớn các đơn vị đơn phân $A\beta$ với các sợi mảnh rất nhỏ phân tử cao bằng ít nhất 50%, đặc biệt bằng ít nhất 60%, đặc biệt bằng ít nhất 65%, đặc biệt hơn bằng ít nhất 75%, thậm chí đặc biệt bằng ít nhất 80%, nhưng đặc biệt bằng ít nhất 85%-90%, hoặc nhiều hơn như so với các chất đơn phân peptit tinh bột tương ứng ủ trong dung dịch đệm (đối chứng), với tỷ lệ nồng độ mol của kháng thể với $A\beta_{1-42}$ đến 1:1000, cụ thể là với tỷ lệ nồng độ mol khoảng 1:10 và 1:100, nhưng đặc biệt là với tỷ lệ nồng độ mol 1:10.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng ức chế sự kết tụ của các chất đơn phân $A\beta$ và/hoặc các chất đa phân tan được $A\beta$ bao gồm phần lớn các đơn vị đơn phân $A\beta$ này với các sợi đa phân mảnh rất nhỏ phân tử cao bằng ít nhất 30% với tỷ lệ nồng độ mol của kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:100.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng ức chế sự kết tụ của các chất đơn phân $A\beta$ và/hoặc các chất đa phân tan được $A\beta$ bao gồm phần lớn các đơn vị đơn phân $A\beta$ này với các sợi đa phân mảnh rất nhỏ phân tử cao bằng ít nhất 80% tỷ lệ nồng độ mol của kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:10.

Sự gắn kết của kháng thể theo sáng chế và như được mô tả ở đây với các peptit tạo tinh bột đơn phân và/hoặc đa phân nhưng, đặc biệt là với dạng tinh bột (1-42) làm ức chế sự kết tụ của các peptit tạo tinh bột đơn phân và/hoặc đa phân với các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ phân tử cao. Nhờ ức chế sự kết tụ của các peptit tạo tinh bột đơn phân và/hoặc đa phân kháng thể theo sáng chế có khả năng phòng ngừa hoặc làm chậm lại sự hình thành các mảng dạng tinh bột, đặc biệt là dạng tinh bột (1-42), được biết là không tan bởi sự thay đổi của cấu hình riêng sơ cấp và là một phần quan trọng của các mảng dạng tinh bột ở não của động vật hoặc người bị bệnh.

Khả năng ức chế sự kết tụ của kháng thể theo sáng chế có thể được xác định bằng cách làm ly tâm tỷ trọng-gradien mật độ tiếp theo là phân tích sa lắng SDS-PAGE trên gradien đã tạo ra trước và/hoặc bằng thử nghiệm huỳnh quang thioflavin T (Th-T).

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm tương thích với người như được mô tả ở đây bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng, kháng thể đó, khi cùng ủ,

đặc biệt là với tỷ lệ nồng độ mol khoảng 1:5 và 1:1000, đặc biệt là khoảng 1:10 và 1:500, đặc biệt hơn là với tỷ lệ là 1:10 đến 1:300, thậm chí đặc biệt hơn là với tỷ lệ khoảng 1:10 và 1:100, với các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ tinh bột phân tử cao đã tạo ra trước đó được tạo ra bởi sự kết tụ của các peptit đơn phân $A\beta$ có ít nhất 30, cụ thể là ít nhất 35, đặc biệt hơn là ít nhất 38, thậm chí đặc biệt hơn là ít nhất 40 các gốc axit amin và, nhưng đặc biệt là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có khả năng làm tan rã các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ đa phân tạo ra trước đó bằng ít nhất 20%, đặc biệt bằng ít nhất 30%, đặc biệt hơn bằng ít nhất 35%, thậm chí đặc biệt hơn bằng ít nhất 40%, nhưng đặc biệt bằng ít nhất 50% hoặc nhiều hơn.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, khả năng ức chế sự kết tụ và làm tan rã của kháng thể lần lượt được xác định bằng làm siêu ly tâm tỷ trọng-gradien tiếp theo là phân tích sa lắng SDS-PAGE trên gradien đã tạo ra trước đó.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, khả năng ức chế sự kết tụ và làm tan rã của kháng thể lần lượt được xác định bằng thử nghiệm huỳnh quang thioflavin T (Th-T).

Theo một phương án đặc biệt khác, kháng thể theo sáng chế được cùng ủ với các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ tinh bột đa phân phân tử cao đã tạo ra trước đó trong 12 giờ đến 36 giờ, cụ thể là trong 18 giờ đến 30 giờ, đặc biệt hơn là trong 24 giờ ở nhiệt độ khoảng 28°C và 40°C, cụ thể là trong khoảng 32°C và 38°C, đặc biệt hơn là ở 37°C.

Đặc biệt, quá trình cùng ủ với các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ tinh bột đa phân phân tử cao đã tạo ra trước đó được tiến hành trong 24 giờ ở nhiệt độ 37°C.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, kháng thể, đặc biệt là kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng có khả năng làm tan rã các

sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ đa phân phân tử cao đã tạo ra trước đó bằng ít nhất 24% với tỷ lệ nồng độ mol của kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:100.

Theo một phương án đặc biệt khác của sáng chế, kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng có thể làm tan rã các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ đa phân phân tử cao đã tạo ra trước đó bằng ít nhất 32% với tỷ lệ nồng độ mol của kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:10.

Bằng cách làm tan rã các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ đa phân tạo tinh bột kháng thể theo sáng chế có thể phòng ngừa hoặc làm chậm lại sự hình thành của các mảng dạng tinh bột nhờ đó làm giảm các triệu chứng liên quan đến bệnh và làm chậm hoặc đảo ngược tiến trình của nó.

Vì vậy, phương án khác nữa của sáng chế là đề xuất kháng thể, cụ thể là kháng thể được làm tương thích với người, bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng như được mô tả ở đây, kháng thể đó có thể làm giảm lượng tổng của $A\beta$ ở não của động vật, đặc biệt là động vật có vú, nhưng đặc biệt là người bị bệnh hoặc tình trạng có thể làm tăng nồng độ của $A\beta$ ở não.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể đó có tác dụng kép ở chỗ nó thể hiện cả đặc tính ức chế kết tụ cũng như đặc tính làm tan rã, đặc biệt là bắt cặp với mức độ cao của tính nhạy cấu hình riêng.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể đó, khi cùng ủ với các peptit tinh bột đơn phân và/hoặc các peptit tinh bột đa phân tan được, cụ thể là với các peptit đơn phân dạng tinh bột β như, ví dụ các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, hoặc 1-42, và/hoặc peptit tinh bột đa phân tan được β bao gồm phần

lớn các đơn vị đơn phân $A\beta$ này, nhưng đặc biệt là với peptit tinh bột đơn phân $A\beta_{1-42}$ và/hoặc peptit tinh bột đa phân tan được $A\beta$ bao gồm phần lớn các đơn vị đơn phân $A\beta_{1-42}$ này, ức chế sự kết tụ của các chất đơn phân $A\beta$ trong các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ đa phân phân tử cao và, ngoài ra, khi cùng ủ với các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ tinh bột đa phân phân tử cao được tạo ra bằng sự kết tụ của các peptit đơn phân dạng tinh bột, cụ thể là các peptit đơn phân dạng tinh bột β như, ví dụ các peptit đơn phân $A\beta$ 1-39; 1-40, 1-41, hoặc 1-42, nhưng đặc biệt là các peptit đơn phân $A\beta_{1-42}$, có thể làm tan rã các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ đa phân đã tạo ra trước đó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể đó có khả năng kích thích sự đồng hoán của cấu hình riêng tằm β hướng về cấu hình riêng xoắn α và/hoặc cấu hình riêng xoắn ngẫu nhiên, nhưng đặc biệt là cấu hình riêng xoắn ngẫu nhiên, nhưng đặc biệt là cấu hình xoắn ngẫu nhiên tại vị trí đã cho trong phân tử, đặc biệt trong môi trường của Tyr 10 và Val 12 của protein $A\beta$, nó làm tăng cấu hình riêng xoắn ngẫu nhiên do cấu hình riêng tằm β tạo ra và sự hoà tan cải thiện của các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ đa phân tinh bột phân tử cao đã tạo ra trước đó. Đặc biệt làm giảm các lượng cấu hình riêng tằm β đến ít nhất 30%, đặc biệt đến ít nhất 35%, đặc biệt hơn đến ít nhất 40% và nhiều hơn so với các sợi mảnh rất nhỏ hoặc các sợi tơ đa phân tinh bột đã tạo ra trước đó tương ứng ủ trong dung dịch đệm (đối chứng).

Khả năng của kháng thể để kích thích sự đồng hoán ở cấu trúc thứ phát được xác định bằng phép phổ học trạng thái rắn ^{13}C NMR, nhưng đặc biệt, bằng cách xác định các cường độ tích hợp của các cấu hình riêng của Tyr 10 và Val 12 $C\beta$ trong peptit $A\beta_{1-42}$.

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần

của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, được đề xuất bao gồm ít nhất một chuỗi nhẹ hoặc một phần của chúng hoặc ít nhất một chuỗi nặng hoặc một phần của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần này gắn kết với chất đơn phân $A\beta$ với ái lực gắn kết cao với K_D nằm trong khoảng ít nhất khoảng 1×10^{-7} M đến ít nhất khoảng 1×10^{-12} M, cụ thể là ít nhất khoảng 1×10^{-8} M đến ít nhất khoảng 1×10^{-11} M, đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 1×10^{-9} M đến ít nhất khoảng 1×10^{-10} M, thậm chí đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 1×10^{-8} M đến ít nhất khoảng 2×10^{-8} M, nhưng tốt hơn là không thể hiện tính phản ứng chéo đáng kể bất kỳ nào với protein tiền chất tinh bột (APP).

Theo một phương án khác của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, được đề xuất bao gồm ít nhất một chuỗi nhẹ hoặc một phần của chúng hoặc ít nhất một chuỗi nặng hoặc một phần của chúng, trong đó kháng thể hoặc phần này gắn kết với sợi, sợi mảnh rất nhỏ hoặc sợi tơ $A\beta$ với ái lực gắn kết cao với K_D nằm trong khoảng ít nhất khoảng 1×10^{-7} M đến ít nhất khoảng 1×10^{-12} M, cụ thể là ít nhất khoảng 1×10^{-8} M đến ít nhất khoảng 1×10^{-11} M, đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 1×10^{-9} M đến ít nhất khoảng 1×10^{-10} M, thậm chí đặc biệt hơn là ít nhất khoảng 2×10^{-9} M đến ít nhất khoảng 5×10^{-9} M, nhưng tốt hơn là không thể hiện tính phản ứng chéo đáng kể bất kỳ nào với protein tiền chất tinh bột (APP).

Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây hoặc một phần của chúng, thể hiện ái lực gắn kết với sợi, sợi mảnh rất nhỏ hoặc sợi tơ $A\beta$ cao hơn ít nhất là 2 lần, đặc biệt ít nhất là 4 lần, đặc biệt là ít nhất 10 lần, đặc biệt là ít nhất 15 lần, đặc biệt hơn là ít nhất 20 lần, nhưng đặc biệt là ít nhất 25 lần so với ái lực gắn kết với chất đơn phân $A\beta$.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất như được mô tả trên đây, kháng thể đó về cơ bản gắn kết với $A\beta$

tích tụ, bao gồm các mảng $A\beta$, ở động vật có vú, cụ thể là não người nhưng tốt hơn là không thể hiện tính phản ứng chéo đáng kể bất kỳ nào với protein tiền chất tinh bột (APP).

Theo một khía cạnh của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất như được mô tả trên đây, kháng thể đó về cơ bản gắn kết với tinh bột đa phân tan được, cụ thể là tinh bột β ($A\beta$), bao gồm các chất đơn phân $A\beta$, ở động vật có vú, cụ thể là não người nhưng tốt hơn là không thể hiện tính phản ứng chéo đáng kể bất kỳ nào với protein tiền chất tinh bột (APP).

Sáng chế còn đề xuất kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, kháng thể đó làm giảm đáng kể lượng mảng tích tụ $A\beta$ ở động vật có vú, cụ thể là não người. Điều này có thể đạt được hoặc bằng sự gắn kết của kháng thể với mảng hoặc bằng cách chuyển đổi sự cân bằng giữa tinh bột, cụ thể là tinh bột β ($A\beta$), ở trạng thái không tan và kết tụ của nó thành dạng tan được của nó bằng cách làm tan rã các sợi thành các dạng đơn phân và đa phân tan được bằng cách kích thích chuyển đổi cấu hình và gắn kết và làm ổn định các dạng tinh bột không kết tụ và hoà tan, cụ thể là các dạng tinh bột β ($A\beta$), trong mô và/hoặc các dịch thể, cụ thể là não. Nhờ hoạt tính của kháng thể theo sáng chế mà quá trình dị hoá và thanh thải ngoại biên thay vì lắng đọng ở mô và/hoặc các dịch thể, cụ thể là não. Vì vậy lợi ích của kháng thể theo sáng chế có thể đạt được mà không có sự gắn kết của kháng thể với mảng.

Nhờ hoạt tính ổn định này, kháng thể theo sáng chế có thể trung hoà các tác dụng độc của protein dạng tinh bột tan được ít tích tụ và đa phân, đặc biệt là protein tinh bột β ($A\beta$), trong mô và/hoặc các dịch thể. Vì vậy, theo một phương án đặc biệt của sáng chế, kháng thể theo sáng chế có thể đạt được các lợi ích mà không cần gắn kết tinh bột beta tích tụ trong não.

Theo một khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, được đề xuất bao gồm ít nhất một chuỗi nhẹ hoặc một phần của chúng hoặc ít nhất một chuỗi nặng hoặc một phần của chúng kết hợp ít nhất một, đặc biệt là hai và đặc biệt hơn là ba vùng CDR thu được từ kháng thể cho chuột nhất, đặc biệt là từ kháng thể ACI-01-Ab7C2 (gọi là "mC2" và hC2 đối với kháng thể được làm tương thích với người C2, trong toàn bộ sáng chế) nộp lưu 01 December 2005 tại cơ quan lưu giữ "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ở Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, với số hiệu lưu giữ DSM ACC2750, trong đó kháng thể này hoặc phần của chúng có ái lực với kháng nguyên $A\beta$ cao hơn ít nhất là 5 lần, đặc biệt là ít nhất 8 lần, đặc biệt hơn là ít nhất 10 lần, nhưng đặc biệt là ít nhất 15 lần so với ái lực của kháng thể cho chuột nhất.

Kháng thể theo sáng chế này có thể, theo một phương án, kháng thể nguyên vẹn (ví dụ với hai chuỗi nhẹ có độ dài đầy đủ và hai chuỗi nặng có độ dài đầy đủ) của isotyp và kiểu phụ bất kỳ nào (ví dụ IgM, IgD, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgE, IgA1 và IgA2); nhưng đặc biệt là kháng thể của isotyp IgG4; vì vậy, theo một phương án khác, nó có thể là phần gắn kết kháng nguyên (ví dụ Fab, F(ab')₂, và Fv) của kháng thể nguyên vẹn.

Vì vậy, sáng chế cũng đề xuất các phần gắn kết kháng nguyên của kháng thể được mô tả ở đây. Theo một phương án của sáng chế, phần này được chọn từ nhóm bao gồm phần Fab, phần Fab', phần F(ab)₂, và phần Fv, bao gồm các sản phẩm của thư viện biểu hiện miễn dịch globulin Fab và các phần gắn kết epitop của kháng thể bất kỳ nào trong số các kháng thể và các phần nêu trên.

Theo một phương án khác, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên của sáng chế được kết hợp với polyetylen glycol. Theo một phương án khác nữa, vùng ổn định của kháng thể theo sáng chế được cải biến để giảm ít nhất một chức năng tác động sinh học do vùng ổn định tạo ra so với kháng thể chưa cải

biến. Theo một phương án khác nữa, kháng thể hoặc phần gắn kết kháng nguyên theo sáng chế bao gồm vùng Fc có chức năng tác động biến đổi.

Sáng chế còn đề xuất phân tử nucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hoá kháng thể dạng khả hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như đề cập trên đây.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất phân tử nucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hoá đoạn chứa các phân tử axit amin kề cận như đã nêu trong các trình tự SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:3, tương ứng, hoặc trình tự bổ trợ thể hiện các vùng xác định bổ trợ (CDRs) 2 và 3 của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Đặc biệt hơn là, sáng chế đề xuất phân tử nucleotit bao gồm trình tự nucleotit mã hoá đoạn chứa các phân tử axit amin kề cận như đã nêu trong SEQ ID NO:4, hoặc trình tự bổ trợ, thể hiện các vùng xác định bổ trợ (CDRs) 1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Theo một phương án khác của sáng chế, phân tử nucleotit được đề xuất bao gồm trình tự nucleotit như đã nêu trong các trình tự SEQ ID NO:18 và SEQ ID NO: 19, hoặc trình tự bổ trợ, mã hoá trình tự axit amin của CDR 2 và CDR 3 tương ứng, của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR).

Theo một phương án khác của sáng chế, phân tử nucleotit được đề xuất bao gồm trình tự nucleotit như đã nêu trong SEQ ID NO:20, hoặc trình tự bổ trợ, mã hoá trình tự nucleotit của CDR 1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR).

Theo một phương án khác của sáng chế, phân tử nucleotit được đề xuất bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:21, hoặc trình tự bổ trợ, mã hoá vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

Theo một phương án khác của sáng chế, phân tử nucleotit được đề xuất bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:22, hoặc trình tự bổ trợ, mã hoá vùng biến đổi nhẹ hoàn toàn bao gồm các trình tự tín hiệu.

Theo một phương án khác của sáng chế, phân tử nucleotit được đề xuất bao gồm trình tự nucleotit mã hoá vùng biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:22 và vùng ổn định chuỗi nhẹ của SEQ ID NO:23. Sáng chế cũng bao gồm dải hỗ trợ của phân tử nucleotit.

Theo một phương án khác của sáng chế, phân tử nucleotit được đề xuất bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:24 mã hoá vùng biến đổi chuỗi nặng. Sáng chế cũng bao gồm dải hỗ trợ của phân tử nucleotit này.

Theo một phương án khác của sáng chế, phân tử nucleotit được đề xuất bao gồm trình tự nucleotit của SEQ ID NO:25 mã hoá vùng biến đổi nặng hoàn toàn bao gồm các trình tự tín hiệu. Sáng chế cũng bao gồm dải hỗ trợ của phân tử nucleotit này. Theo một phương án khác của sáng chế phân tử nucleotit được đề xuất bao gồm trình tự nucleotit mã hoá vùng biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO:25 và vùng ổn định chuỗi nặng của SEQ ID NO:26. Sáng chế cũng bao gồm dải hỗ trợ của phân tử nucleotit này.

Sáng chế cũng bao gồm trình tự nucleotit được lai hoá với một trong các trình tự nucleotit mã hoá kháng thể nêu trên theo sáng chế, đặc biệt là với dải hỗ trợ của chúng, hoặc dưới dạng phân lập hoặc như một phần của phân tử nucleotit lớn hơn.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất trình tự nucleotit lai trong các điều kiện lai hoá thông thường, đặc biệt là trong các điều kiện lai nghiêm ngặt, với trình tự bất kỳ trong số các trình tự nucleotit đã cho trong các trình tự từ SEQ ID NO: 18 đến SEQ ID NO:26 và từ SEQ ID NO:29 đến SEQ ID NO:32, cụ thể là với dải hỗ trợ của chúng.

Theo một phương án khác của sáng chế, vật truyền biểu hiện được đề xuất bao gồm phân tử axit nucleic theo sáng chế và như đề cập ở trên.

Theo một phương án khác của sáng chế, tế bào được đề xuất bao gồm vật truyền biểu hiện bao gồm axit nucleic theo sáng chế và như đề cập ở trên.

Theo một phương án khác nữa, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc bất kỳ dẫn xuất nào hoặc các phần chức của chúng, với lượng có tác dụng điều trị, đặc biệt chế phẩm đó là dược phẩm tùy ý còn chứa chất mang được dụng.

Theo một phương án khác của sáng chế, chế phẩm này bao gồm kháng thể với lượng có tác dụng điều trị.

Sáng chế còn bao gồm hỗn hợp chứa kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc bất kỳ dẫn xuất nào hoặc các phần chức của chúng, với lượng có tác dụng điều trị và, tùy ý, chất có hoạt tính sinh học khác và/hoặc chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất hỗn hợp, trong đó chất có hoạt tính sinh học khác là hợp chất sử dụng để làm thuốc chữa bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến protein tương tự tinh bột hoặc dạng tinh bột như protein A β liên quan đến bệnh Alzheimer.

Theo một phương án khác của sáng chế, chất có hoạt tính sinh học khác hoặc hợp chất có thể cũng là tác nhân điều trị có thể được sử dụng để điều trị bệnh thoái hoá dạng tinh bột do tinh bột β gây ra hoặc có thể được sử dụng để làm thuốc chữa các rối loạn thần kinh khác.

Chất có hoạt tính sinh học khác hoặc hợp chất có thể sử dụng tác dụng sinh học của nó bằng cùng một cơ chế hoặc tương tự như kháng thể theo sáng

chế hoặc bằng một cơ chế hoạt động không liên quan hoặc bằng vô số các cơ chế hoạt động liên quan và/hoặc không liên quan.

Nói chung, hợp chất có hoạt tính sinh học có thể bao gồm các chất tăng cường dẫn truyền thần kinh, các dược chất tâm lý liệu pháp, các chất ức chế axetylcholin esterase, các chất chặn kênh canxi, các amin nguồn gốc sinh vật, các thuốc an thần benzodiazepin, các chất tăng cường tổng hợp, lưu giữ, hoặc giải phóng axetylcholin, các chất đối kháng thụ thể axetylcholin sau khớp thần kinh, các chất ức chế monoamin oxidaza-A hoặc -B, các chất đối kháng thụ thể N-metyl-D-aspartat glutamat, các dược chất kháng viêm không steroid, các chất chống oxy hoá và các chất đối kháng thụ thể tạo serotonin.

Đặc biệt hơn là, sáng chế đề xuất hỗn hợp bao gồm ít nhất một hợp chất được chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất có tác dụng chống sự mất cân bằng oxy hoá, các hợp chất chống gây chết tế bào, các chất chelat kim loại, các chất ức chế cặp ADN như pirenzepin và các chất chuyển hoá, axit 3-amino-1-propansulfonic (3APS), 1,3-propandisulfonat (1,3PDS), các chất hoạt hoá α -secretaza, các chất ức chế β - và γ -secretaza, các protein tau, các chất dẫn truyền thần kinh, các chất bề gãy tấm β , các chất dẫn dụ cho các thành phần tế bào làm sạch/làm tan tinh bột beta, các chất ức chế tinh bột beta làm cùn đầu N bao gồm tinh bột pyroglutamat hoá beta 3-42, các phân tử chống viêm, hoặc các chất ức chế cholinesteraza (ChEIs) như tacrin, rivastigmin, donepezil và/hoặc galantamin, các chất đối kháng M1 và các dược chất khác bao gồm dược chất cải biến tau hoặc tinh bột bất kỳ nào và các chất bổ sung dinh dưỡng, cùng với kháng thể theo sáng chế và, tùy ý, chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Sáng chế còn đề xuất hỗn hợp, trong đó hợp chất là chất ức chế cholinesteraza (ChEIs), cụ thể là hỗn hợp, trong đó hợp chất là chất được chọn từ nhóm bao gồm tacrin, rivastigmin, donepezil, galantamin, niacin và memantin.

Theo một phương án khác, các hỗn hợp theo sáng chế có thể bao gồm niacin hoặc memantin cùng với kháng thể theo sáng chế và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Theo một phương án khác nữa của sáng chế, các hỗn hợp được đề xuất bao gồm "các thuốc chống loạn tâm thần không điển hình" như, ví dụ clozapin, ziprasidon, risperidon, aripiprazol hoặc olanzapin để điều trị các triệu chứng loạn tâm thần dương tính và âm tính bao gồm các chứng ảo giác, các chứng hoang tưởng, các rối loạn tư duy (biểu thị bởi sự không mạch lạc rõ rệt, trật hướng, lệch lạc), và lối sống kỳ dị hoặc không có tổ chức, cũng như sự mất khoái cảm, vô cảm, tính lãnh đạm, và rút khỏi xã hội, cùng với kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả ở đây và, tùy ý, chất mang được dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược.

Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, các chế phẩm và các hỗn hợp theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm kháng thể và chất có hoạt tính sinh học, tương ứng, với lượng có tác dụng điều trị.

Các hợp chất có thể thích hợp để sử dụng trong các hỗn hợp kết hợp với kháng thể theo sáng chế được đề xuất trong Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế số WO 2004/058258 (đặc biệt xem các trang 16 và 17) bao gồm các đích được chất điều trị (các trang 36-39), axit alkansulfonic và các axit alkanolsulfuric (các trang 39-51), các chất ức chế cholinesteraza (các trang 51-56), NMDA các chất đối kháng thụ thể (các trang 56-58), các estrogen (các trang 58-59), các dược chất kháng viêm không steroid (các trang 60-61), các chất chống oxy hoá (các trang 61-62), các chất đối kháng thụ thể hoạt hoá tăng sinh peroxisom (PPAR) (các trang 63-67), các tác nhân làm giảm cholesterol (các trang 68-75); các chất ức chế tinh bột (các trang 75-77), các chất ức chế hình thành tinh bột (các trang 77-78), các chất chelat hoá kim loại (các trang 78-79),

các chất chống suy nhược và chống loạn tâm thần (các trang 80-82), các chất bổ sung dinh dưỡng (các trang 83-89) và các hợp chất làm tăng tính sử dụng của các chất có hoạt tính sinh học trong não (xem các trang 89-93) và tiền dược chất (các trang 93 và 94), tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất hỗn hợp bao gồm kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây và/hoặc chất có hoạt tính sinh học với lượng có tác dụng điều trị.

Sáng chế còn đề xuất việc sử dụng kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây và/hoặc phần chức của chúng và/hoặc được phẩm, hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này, để bào chế thuốc để điều trị hoặc làm giảm bớt các tác động của bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và bệnh thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi như các bệnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với chứng thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch) và bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia. Các bệnh khác dựa vào hoặc liên quan đến các protein tương tự tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác, bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp để bào chế kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc

một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây và/hoặc phân chức của chúng và/hoặc được phẩm, hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này và/hoặc phân chức của chúng, cụ thể là với lượng có tác dụng điều trị, để sử dụng trong phương pháp phòng ngừa, điều trị hoặc làm giảm các tác động của bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và bệnh thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi như các bệnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với chứng thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia. Các bệnh khác dựa vào hoặc liên quan đến các protein tương tự tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng bao gồm bào chế kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế dưới dạng được dụng.

Sáng chế cũng bao gồm phương pháp để phòng ngừa, điều trị hoặc làm giảm các tác động của bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và bệnh thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi như các bệnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với chứng thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia. Các bệnh khác dựa vào hoặc liên quan đến các protein tương tự tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ

cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng bằng cách cung cấp kháng thể và/hoặc phân chức của chúng, nhưng đặc biệt là kháng thể được làm tương thích với người và/hoặc phân chức của chúng, hoặc chế phẩm hoặc hỗn hợp bao gồm kháng thể này và/hoặc phân chức của chúng, cho động vật hoặc người bị tác động bởi rối loạn này bao gồm cung cấp kháng thể với lượng có tác dụng điều trị.

Mục đích nữa của sáng chế là đề xuất phương pháp để điều trị bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và bệnh thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), cụ thể là bệnh hoặc tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng nhớ liên quan đến nhận thức ở động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người, kháng thể, cụ thể là được phẩm theo sáng chế và như được mô tả ở đây.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất phương pháp để duy trì hoặc làm tăng khả năng nhớ liên quan đến nhận thức nhưng cụ thể là, để hồi phục khả năng nhớ liên quan đến nhận thức của động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người, bị suy giảm trí nhớ bằng cách cung cấp kháng thể cho động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người, cụ thể là được phẩm theo sáng chế và như được mô tả trên đây.

Mục đích khác nữa của sáng chế là đề xuất chế phẩm điều trị và phương pháp để tạo ra chế phẩm này cũng như phương pháp để điều trị bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và bệnh thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), cụ thể là bệnh hoặc tình trạng đặc trưng bởi

sự mất khả năng nhớ liên quan đến nhận thức, nhờ sử dụng kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất việc điều trị cho động vật, cụ thể là động vật có vú hoặc người, bị trạng liên quan đến tinh bột đặc trưng bởi sự mất khả năng nhớ liên quan đến nhận thức dẫn đến duy trì khả năng nhớ liên quan đến nhận thức.

Sáng chế còn đề xuất phương pháp để chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng liên quan đến tinh bột ở bệnh nhân bao gồm phát hiện gắn kết miễn dịch đặc hiệu của kháng thể hoặc phân hoạt tính của chúng với epitop của protein dạng tinh bột trong mẫu hoặc tại chỗ bao gồm các bước:

(a) đưa mẫu hoặc phần cơ thể hoặc vùng cơ thể đặc biệt nghi ngờ chứa protein dạng tinh bột vào tiếp xúc với kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, và/hoặc phần chức của chúng, kháng thể đó gắn kết với epitop của protein dạng tinh bột;

(b) cho phép kháng thể và/hoặc phần chức của chúng, gắn kết với protein dạng tinh bột tạo phức hệ miễn dịch;

(c) phát hiện sự hình thành của phức hệ miễn dịch; và

(d) tạo tương quan giữa sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của protein dạng tinh bột trong mẫu hoặc phần cơ thể hoặc vùng cơ thể đặc biệt.

Cũng nằm trong sáng chế là phương pháp để xác định mức độ của lượng mảng tạo tinh bột tích tụ ở mô và/hoặc dịch thể bao gồm các bước:

(a) lấy mẫu đại diện của mô và/hoặc các dịch thể cần nghiên cứu;

(b) thử nghiệm mẫu này về sự có mặt của protein dạng tinh bột với kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, và/hoặc phân chức của chúng;

(c) xác định lượng kháng thể gắn kết với protein; và

(d) tính toán lượng mảng tích tụ ở mô và/hoặc các dịch thể.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất phương pháp để xác định mức độ của lượng mảng tạo tinh bột tích tụ ở mô và/hoặc các dịch thể, trong đó sự hình thành của phức hệ miễn dịch ở bước c) được xác định sao cho sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch tương quan với sự có mặt hoặc vắng mặt của protein dạng tinh bột.

Theo một phương án khác của sáng chế, kit thử nghiệm để phát hiện và chẩn đoán các bệnh và tình trạng liên quan đến tinh bột được đề xuất bao gồm kháng thể, cụ thể là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sáng chế và như được mô tả trên đây, và/hoặc phân chức của chúng.

Đặc biệt, sáng chế đề xuất kit thử nghiệm để phát hiện và chẩn đoán các bệnh và tình trạng liên quan đến tinh bột bao gồm thùng chứa chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế, và/hoặc phân chức của chúng, và các tài liệu hướng dẫn để sử dụng kháng thể nhằm mục đích gắn kết với protein dạng tinh bột tạo phức hệ miễn dịch và phát hiện sự hình thành của phức hệ miễn dịch sao cho sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch tương quan với sự có mặt hoặc vắng mặt của protein dạng tinh bột.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm vùng biến đổi như nêu trong SEQ ID NO:27, hoặc thể biến dị của chúng. Theo một phương án, dòng tế bào biểu hiện kháng thể.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất gen kháng thể bao gồm vùng biến đổi như nêu trong SEQ ID NO:29, hoặc thể biến dị của chúng. Theo một phương án, dòng tế bào biểu hiện kháng thể.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để làm tan rã các sợi tinh bột beta đã hình thành trước đó, bao gồm tương tác kháng thể hC2 với các sợi tinh bột beta tạo ra trước đó.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này hoặc phần của chúng bảo vệ các neuron tránh khỏi sự suy thoái do $A\beta$ gây ra.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp để phòng ngừa sự suy thoái các neuron do $A\beta$ gây ra bao gồm điều trị các neuron bằng một lượng hữu hiệu của kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sự mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất cách sử dụng kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng theo sự mô tả ở đây để bào chế thuốc phòng ngừa sự suy thoái các neuron khi tiếp xúc với oligome $A\beta$.

Các mục đích này và mục đích khác, các đặc điểm và lợi ích của sáng chế sẽ là hiển nhiên sau khi xem xét phần mô tả chi tiết dưới đây phương án thực hiện đề xuất và các yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1 (cấu trúc của các gen kháng thể dạng khảm) thể hiện biểu hiện catxet của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chuột của kháng thể dạng khảm.

Fig.2 (cấu trúc của các gen kháng thể dạng khảm 2) thể hiện biểu hiện catxet của vùng biến đổi chuỗi nặng chuột của kháng thể dạng khảm.

Fig.3 (vùng biến đổi chuỗi nặng) thể hiện sự so sánh vùng biến đổi chuỗi nặng chuột với trình tự dòng mầm chuột gần nhất.

Fig.4 (hoạt tính của kháng thể được làm tương thích với người C2) là biểu đồ thể hiện hoạt tính của các kháng thể được làm tương thích với người tinh khiết C2.

Fig.5 (các cải biến với CDR12) là biểu đồ thể hiện hoạt tính gắn kết của các kháng thể tạo ra bởi quá trình biểu hiện tạm thời của các cấu trúc CDR12 được cải biến bằng C2 cùng với chuỗi nặng dạng khảm C2, so với kháng thể dạng khảm C2ChVHAF/ChVK, được tạo ra bởi quá trình chuyển nhiễm tạm thời và kháng thể tinh khiết.

Fig.6 (thử nghiệm gắn kết hoá học mô miễn dịch) là ảnh chụp các kết quả của thử nghiệm gắn kết miễn dịch hoá học mô với kháng thể dạng khảm AF và kháng thể được làm tương thích với người H4K1.

Fig.7 (chức năng của mC2 đối với các sợi tinh bột) là biểu đồ thể hiện chức năng của mC2 đối với các sợi tinh bột.

Fig.8 (chức năng của mC2 đối với các sợi tinh bột) là biểu đồ thể hiện ái lực gắn kết của C2 được làm tương thích với người trong ELISA.

Fig.9 (gắn kết đặc hiệu cấu hình của mC2 với các loại protein dạng tinh bột khác nhau) là biểu đồ thể hiện cấu hình riêng gắn kết đặc hiệu của mC2 với các loại khác nhau của protein dạng tinh bột; chế phẩm dạng viên trong ghi chú của biểu đồ đề cập đến các sợi $A\beta_{1-42}$, chế phẩm dạng dịch nổi đề cập đến các đơn chất tinh bột.

Fig.10 là các trình tự được làm tương thích với người C2 VK so với trình tự chuột và các trình tự thụ thể người DPK1 5 Và Jk1.

Fig.11 là các trình tự được làm tương thích với người C2 VH so với trình tự chuột và các trình tự thụ thể người DP54 Và J_H6.

Fig.12 là trình tự ADN hoàn chỉnh và trình tự protein của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của C2 kháng thể được làm tương thích với người, C2HuVK1.

Fig.13 là trình tự ADN hoàn chỉnh và trình tự protein của vùng ổn định chuỗi nhẹ (C Kappa người) của kháng thể được làm tương thích với người C2.

Fig.14 là trình tự ADN hoàn chỉnh và trình tự protein của vùng ổn định chuỗi nặng (IgG4 ser228-pro người) của kháng thể được làm tương thích với người C2.

Fig.15A-C (vẽ bản đồ epitop của kháng thể đơn dòng của miễn dịch AC hC2) là biểu đồ thể hiện các kết quả của các thử nghiệm vẽ bản đồ.

Fig.16 (các tác động của hC2 kháng tinh bột đối với sự kết tụ của peptit tinh bột 1-42) là biểu đồ thể hiện kết quả của các thử nghiệm kết tụ.

Fig.17 (các tác động của hC2 kháng tinh bột đối với sự kết tủa của peptit tinh bột 1-42) là biểu đồ thể hiện kết quả của các thử nghiệm làm tan rã.

Fig.18 (bảo vệ thần kinh bằng kháng thể hC2) là ảnh chụp các kết quả của các thử nghiệm bảo vệ neuron bằng kháng thể được làm tương thích với người C2.

SEQ ID NO:1 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF 4 (CDR1).

SEQ ID NO:2 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF 4 (CDR2).

SEQ ID NO:3 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF 4 (CDR3).

SEQ ID NO:4 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2 HuVK 1 (CDR1).

SEQ ID NO:5 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2 HuVK 1 (CDR2).

SEQ ID NO:6 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2 HuVK 1 (CDR3).

SEQ ID NO:7 là trình tự axit amin của vùng epitop A β 2.

SEQ ID NO:8 là trình tự axit amin của vùng epitop A β 1.

SEQ ID NO:9 là trình tự axit amin của vùng epitop A β 2 cải biến.

SEQ ID NO:10 là trình tự axit amin của vùng epitop A β 1 cải biến.

SEQ ID NO:11 là trình tự axit amin của vùng epitop cải biến hoàn toàn.

SEQ ID NO:12 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2 HuVK 1.

SEQ ID NO:13 là trình tự axit amin của chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2.

SEQ ID NO:14 là trình tự axit amin của vùng ổn định chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2.

SEQ ID NO:15 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO:16 là trình tự axit amin của chuỗi nặng được làm tương thích với người C2.

SEQ ID NO:17 là trình tự axit amin của chuỗi IG GAMMA-4 vùng C REGION cải biến.

SEQ ID NO:18 là trình tự nucleotit của CDR2 của vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF.

SEQ ID NO:19 là trình tự nucleotit của CDR3 của vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO:20 là trình tự nucleotit của CDR1 của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2 HuVK 1.

SEQ ID NO:21 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2 HuVK 1.

SEQ ID NO:22 là trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2.

SEQ ID NO:23 là trình tự nucleotit của vùng ổn định chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2.

SEQ ID NO:24 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF 4.

SEQ ID NO:25 là trình tự nucleotit của chuỗi nặng được làm tương thích với người C2.

SEQ ID NO:26 là trình tự nucleotit của vùng ổn định được làm tương thích với người C2.

SEQ ID NO:27 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nhẹ chuột C2.

SEQ ID NO:28 là trình tự axit amin của vùng biến đổi chuỗi nặng chuột C2.

SEQ ID NO:29 là trình tự nucleotit của Mouse C2 Vùng biến đổi chuỗi nhẹ.

SEQ ID NO:30 là trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ chuột C2.

SEQ ID NO:31 là trình tự nucleotit của vùng biến đổi chuỗi nặng chuột nhất C2.

SEQ ID NO:32 là trình tự nucleotit của chuỗi nặng chuột C2.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các định nghĩa

Các thuật ngữ "polypeptit", "peptit", và "protein", như được sử dụng ở đây, có thể được sử dụng thay thế cho nhau và được xác định có nghĩa là phân tử sinh học bao gồm các axit amin liên kết bởi liên kết peptit.

Thuật ngữ "a", "an" và "the" như được sử dụng ở đây được xác định có nghĩa là "một hoặc nhiều" và bao gồm số nhiều trừ khi phạm vi không thích hợp.

Cụm từ "các bệnh và các rối loạn gây ra bởi hoặc liên quan đến tinh bột hoặc các protein tương tự tinh bột" bao gồm nhưng không giới hạn ở, các bệnh và các rối loạn do sự có mặt hoặc hoạt tính của protein tương tự tinh bột trong trạng thái đơn phân, sợi mảnh rất nhỏ hoặc đa phân, hoặc tổ hợp bất kỳ nào của ba loại đó. Các bệnh và các rối loạn đó, nhưng không giới hạn ở, bệnh thoái hoá dạng tinh bột, các khối u nội tiết, và thoái hoá điểm vàng.

Thuật ngữ "bệnh thoái hoá dạng tinh bột" đề cập đến nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và bệnh thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi như các bệnh bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD), bao gồm các bệnh hoặc các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng nhớ liên quan đến nhận thức như, ví dụ suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (dạng Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia; cũng như các bệnh khác dựa vào hoặc liên quan đến

các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeld Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; và các bệnh mắt khác nhau bao gồm bệnh thoái hoá điểm vàng, bệnh thần kinh thị giác liên quan đến drusen, và bệnh đục thủy tinh thể do sự lắng đọng tinh bột beta gây ra.

Các thuật ngữ "phát hiện" hoặc "được phát hiện" như được sử dụng ở đây có nghĩa là sử dụng các kỹ thuật đã biết để phát hiện các phân tử sinh học như các phương pháp miễn dịch hoá học hoặc mô học và đề cập đến việc xác định số lượng và chất lượng sự có mặt hoặc nồng độ của phân tử sinh học trong quá trình nghiên cứu.

Thuật ngữ "tinh bột tan polyme" đề cập đến nhiều chất đơn phân tích tự của các peptit dạng tinh bột, hoặc của các peptit tương tự dạng tinh bột, hoặc của các peptit dạng tinh bột được cải biến hoặc cắt cụt hoặc của các dẫn xuất khác của các peptit dạng tinh bột tạo ra các cấu trúc oligome hoặc polyme có thể tan cả trong cơ thể người hoặc động vật có vú đặc biệt hơn là trong não, nhưng đặc biệt là tới nhiều chất đơn phân tích tự của các peptit β ($A\beta$) dạng tinh bột hoặc của các peptit cải biến hoặc cắt cụt β ($A\beta$) hoặc các dẫn xuất của chúng, mà có thể tan trong cơ thể người hoặc động vật có vú đặc biệt hơn là trong não.

Thuật ngữ "dạng tinh bột β , dạng tinh bột $A\beta$ hoặc dạng tinh bột β " là thuật ngữ được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật và đề cập đến các protein và các peptit dạng tinh bột β , protein tiền chất dạng tinh bột β (APP), cũng như các cải biến, các phân và các thể tương đương chức bất kỳ của chúng. Đặc biệt, bằng dạng tinh bột β như sử dụng ở đây có nghĩa là phân bất kỳ nào được tạo ra bằng cách phân giải protein APP nhưng đặc biệt là các phân liên quan đến hoặc kết hợp với bệnh lý tinh bột bao gồm, nhưng không giới hạn ở, $A\beta_{1-38}$, $A\beta_{1-39}$, $A\beta_{1-40}$, $A\beta_{1-41}$, $A\beta_{1-42}$, và $A\beta_{1-43}$.

Cấu trúc và các trình tự của các peptit dạng tinh bột β như đề cập ở trên là đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật và phương pháp để tạo ra các peptit này hoặc chiết xuất chúng từ não và các mô khác được mô tả, ví dụ, trong tài liệu Glenner and Wong, Biochem Biophys Res Comm 129, 885-890 (1984). Ngoài ra, các peptit dạng tinh bột β cũng sẵn có trên thị trường dưới các dạng khác nhau.

Bằng cách "tách" có nghĩa là phân tử sinh học không có ít nhất một số thành phần với chúng nó xuất hiện tự nhiên.

Các thuật ngữ "kháng thể" và "các kháng thể" như được sử dụng ở đây là một thuật ngữ được công nhận trong lĩnh vực kỹ thuật và được hiểu là đề cập đến các phân tử hoặc các phần hoạt tính của các phân tử gắn kết với các kháng nguyên đã biết, đặc biệt với các phân tử globulin miễn dịch và với các phần hoạt tính miễn dịch của các phân tử globulin miễn dịch, nghĩa là các phân tử chứa điểm gắn kết kết hợp đặc hiệu với kháng nguyên. Globulin miễn dịch là protein bao gồm một hoặc nhiều polypeptit về cơ bản được mã hoá bởi các gen vùng ổn định globulin miễn dịch kappa, và lambda, alpha, gama, delta, epsilon và mu, cũng như vô số các gen vùng biến đổi globulin miễn dịch. Các chuỗi nhẹ được phân loại là kappa hoặc lambda. Các chuỗi nặng được phân loại là gamma, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, lần lượt xác định các loại globulin miễn dịch, IgG, IgM, IgA, IgD và IgE tương ứng. Ngoài ra, các lớp phụ của chuỗi nặng là đã biết. Ví dụ các chuỗi nặng IgG ở người có thể là loại bất kỳ trong số lớp phụ IgG1, IgG2, IgG3 và IgG4. Globulin miễn dịch theo sáng chế có thể là loại bất kỳ nào (IgG, IgM, IgD, IgE, IgA và IgY) hoặc lớp phụ (IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) của phân tử globulin miễn dịch.

Như được sử dụng ở đây "gắn kết đặc hiệu" đề cập đến kháng thể có nghĩa là kháng thể đó gắn kết với kháng nguyên đích của nó với ái lực lớn hơn nhiều khi nó gắn kết với (các) kháng nguyên khác nhau về mặt cấu trúc.

Đơn vị cấu trúc globulin miễn dịch thông thường là đã biết bao gồm một cấu trúc tứ phân. Mỗi cấu trúc tứ phân gồm có hai cặp chuỗi polypeptit giống nhau, mỗi cặp có một chuỗi "nhẹ" (khoảng 25 kD) và một chuỗi "nặng" (khoảng 50-70 kD). Đầu tận cùng N của mỗi chuỗi xác định vùng biến đổi gồm khoảng 100 đến 110 hoặc nhiều hơn axit amin cơ bản tạo ra sự nhận biết kháng nguyên. Thuật ngữ chuỗi nhẹ biến đổi (VL) và chuỗi nặng biến đổi (VH) đề cập đến các chuỗi nặng và nhẹ tương ứng.

Kháng thể tồn tại như các kháng thể nguyên vẹn với chiều dài đầy đủ hoặc như là một số các phần được đặc trưng hoá rõ được tạo ra bằng cách phân cắt với các peptidaza hoặc các hoá chất khác nhau. Vì vậy, ví dụ pepsin phân cắt một kháng thể dưới các liên kết disulfua ở vùng bản lề để tạo ra $F(ab')_2$, một dime của Fab mà chính nó là chuỗi nhẹ gắn kết với V_H-CH_1 bằng liên kết disulfua. $F(ab')_2$ có thể được khử trong các điều kiện nhẹ để phá vỡ liên kết disulfua ở vùng bản lề nhờ đó chuyển hoá dime $F(ab')_2$ thành monome Fab'. Monome Fab' về cơ bản là mảnh Fab với một phần của vùng bản lề (xem tài liệu Fundamental Immunology, W. E. Paul, ed., Raven Press, N.Y. (1993), để mô tả chi tiết hơn về các mảnh kháng thể khác). Trong khi các mảnh kháng thể khác nhau được xác định dưới dạng phân cắt kháng thể nguyên vẹn, chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật hiểu rõ rằng bất kỳ mảnh nào trong số các mảnh kháng thể khác nhau có thể được tổng hợp de novo hoặc theo phương diện hoá học hoặc bằng cách sử dụng phương pháp AND tái tổ hợp. Vì vậy, thuật ngữ kháng thể, như được sử dụng ở đây còn bao gồm các mảnh kháng thể hoặc được tạo ra bằng cách cải biến các kháng thể hoàn chỉnh hoặc tổng hợp de novo hoặc các kháng thể và các mảnh thu được bằng cách sử dụng các phương pháp AND tái tổ hợp.

Thuật ngữ "kháng thể" sẽ nằm trong phạm vi của sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, các kháng thể dạng khảm, chuỗi đơn, đặc hiệu kép, được làm tương thích với khỉ, người và được làm tương thích với người cũng như các phần hoạt tính của chúng. Các ví dụ về các phần hoạt tính của các phân tử gắn kết với các kháng nguyên đã biết các chuỗi nặng và nhẹ

tách biệt, các phân Fab, Fab/c, Fv, Fab', và F(ab')₂, bao gồm các sản phẩm chứa thư viện biểu hiện globulin miễn dịch Fab và các phần gắn kết epitop của kháng thể bất kỳ nào trong số các kháng thể và các phần nêu trên.

Các phần hoạt tính có thể thu được từ kháng thể theo sáng chế bằng một số kỹ thuật. Ví dụ các kháng thể đơn dòng có thể được phân cắt bằng một enzym, như pepsin, và chuyển tới lọc gel HPLC. Phần thích hợp chứa các mảnh Fab sau đó có thể được thu gom và cô bằng cách lọc màng và các kỹ thuật tương tự. Để mô tả thêm về các kỹ thuật chung để phân lập các phần hoạt hoá của các kháng thể, xem ví dụ tài liệu Khaw, B. A. *et al.* J. Nucl. Med. 23:1011-1019 (1982); Rousseaux *et al.* Methods Enzymology, 121 :663- 69, Academic Press, 1986.

Các kháng thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp có thể là các kháng thể có độ dài đầy đủ thông thường, các phần kháng thể hoạt hoá đã biết từ quá trình phân cắt phân giải protein, các phần kháng thể hoạt tính đơn nhất như Fv hoặc Fv chuỗi đơn (scFv), các kháng thể khuyết miễn, và các loại tương tự. Kháng thể Fv có kích cỡ khoảng 50 Kd và bao gồm các vùng biến đổi của chuỗi nặng và nhẹ. Polypeptit Fv chuỗi đơn ("scFv") là heterodime liên kết cộng hoá trị VH::VL được biểu hiện từ axit nucleic bao gồm các trình tự mã hoá VH- và VL- hoặc liên kết trực tiếp hoặc liên kết bởi một liên kết mã hoá peptit. Xem tài liệu Huston, *et al.* (1988) Proc. Nat. Acad. Sci. USA, 85:5879-5883. Một số cấu trúc để chuyển hoá các chuỗi polypeptit nặng và nhẹ tích tụ tự nhiên, nhưng tách biệt về phương diện hoá học từ vùng kháng thể V vào phân tử scFv sẽ gấp nếp vào cấu trúc ba chiều về cơ bản tương tự với cấu trúc của điểm gắn kết kháng nguyên. Xem, ví dụ các patent Mỹ số 5,091,513, 5,132,405 và 4,956,778.

Điểm kết hợp đề cập đến phần của phân tử kháng thể tham gia vào gắn kết kháng nguyên. Điểm gắn kết kháng nguyên được tạo ra bởi các gốc axit amin của các vùng biến đổi đầu tận cùng N ("V") của các chuỗi nặng ("H") và chuỗi nhẹ ("L"). Các vùng kháng thể biến đổi bao gồm ba đoạn rất khác nhau để

cập đến “các vùng siêu biến” hoặc “các vùng xác định bổ trợ” (CDRs) đặt giữa nhiều đoạn sườn bảo toàn được biết là “các vùng khung” (FRs). Trong phân tử kháng thể, ba vùng siêu biến của chuỗi nhẹ (LCDR1, LCDR2, và LCDR3) và ba vùng siêu biến của chuỗi nặng (HCDR1, HCDR2 và HCDR3) được sắp đặt tương đối với nhau trong không gian ba chiều để tạo ra bề mặt hoặc ổ gắn kết kháng nguyên. Ba điểm gắn kết kháng thể thể hiện các axit amin cấu thành các CDR của kháng thể và các gốc khung bất kỳ nào cấu thành ổ điểm gắn kết.

Tính đồng nhất của các gốc axit amin trong kháng thể đặc biệt tạo nên điểm gắn kết có thể được xác định nhờ sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, các CDR kháng thể có thể được nhận dạng là các vùng siêu biến được xác định trước tiên bởi Kabat et al. (xem, "Sequences of Proteins of Immunological Interest," E. Kabat et al., U.S. Department of Health and Human Services; Johnson, G and Wu, TT (2001) Kabat Database and its applications: future directions. *Nucleic Acids Research*, 29: 205-206; <http://immuno.bme.nwa.edu>). Các vị trí của các CDR cũng có thể được nhận dạng như các cấu trúc vòng cấu trúc được mô tả trước tiên bởi Chothia and others, (xem tài liệu Chothia and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196, 901 (1987), Chothia et al., *Nature* 342, 877 (1989), và Tramontano et al., *J. Mol. Biol.* 215, 175 (1990)). Các phương pháp khác bao gồm "AbM definition" là sự thoả hiệp giữa Kabat và Chothia và thu được nhờ sử dụng phần mềm mô hình hoá kháng thể kháng thể AbM của Oxford Molecular (hiện nay là Accelrys) hoặc "định nghĩa tiếp xúc" của các CDR bởi Macallum et al., ("Antibody-antigen interactions: contact analysis và binding site topography," *J Mol Biol.* 1996 Oct 11;262(5):732-45). Sơ đồ dưới đây nhận dạng các CDR dựa vào các định nghĩa khác nhau.

Loop	Kabat	AbM	Chothia	Contact
-----	-----	-----	-----	-----
L1	L24 -- L34	L24 -- L34	L24 - L34	L30 -- L36
L2	L50 -- L56	L50 -- L56	L50 -- L56	L46 -- L55
L3	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L97	L89 -- L96
H1	H31 -- H35B	H26 -- H35B	H26 - H32..34	H30 -- H35B

(Cách đánh số Kabat)

H1	H31 -- H35	H26 - H35	H26 - H32	H30 - H35
----	------------	-----------	-----------	-----------

(Cách đánh số Chothia)

H2	H50 -- H65	H50 -- H58	H52 - H56	H47 -- H58
H3	H95 - H102	H95 -- H102	H95 - H102	H93 - H101

Các nguyên tắc chung mà nhờ đó có thể nhận các CDR trong kháng thể từ trình tự riêng là như sau:

LCDR1: Bắt đầu — khoảng chừng gốc 24.

Gốc trước thường là Cys.

Gốc sau thường là Trp. Thông thường TRP đi theo sau là TYR-GLN, nhưng cũng có thể đi theo sau là LEU-GLN, PHE-GLN, hoặc TYR-LEU.

Độ dài là 10 đến 17 gốc.

LCDR2: Bắt đầu - 16 gốc sau đầu tận cùng L1.

Trình tự trước đó thường bắt đầu là ILE-TYR, nhưng cũng có thể là VAL-TYR, ILE-LYS, hoặc ILE-PHE.

Độ dài thường là 7 gốc.

LCDR3: Bắt đầu — thường là 33 gốc sau đầu tận cùng L2.

Gốc trước thường là Cys.

Trình tự sau là Phe-GLY-X-GLY.

Độ dài là 7 đến 11 gốc.

HCDR1: Bắt đầu — vào khoảng gốc 26 (bốn gốc sau CYS) [xác định Chothia/ AbM] xác định Kabat bắt đầu 5 gốc cuối.

Trình tự trước là CYS-X-X-X.

Các gốc sau là TRP, thường tiếp theo là VAL, nhưng cũng tiếp theo là ILE, hoặc ALA.

độ dài là 10 đến 12 gốc theo định nghĩa AbM trong khi định nghĩa Chothia loại trừ 4 gốc cuối cùng.

HCDR2: Bắt đầu - 15 gốc sau đầu tận cùng của định nghĩa Kabat/AbM của CDR-H1.

Trình tự trước thường là LEU-GLU-TRP-ILE-GLY (SEQ ID NO.1), nhưng một số biến đổi là có thể.

Trình tự sau là Lys/ARG-LEU/ILE/VAL/PHE/THR/ALA-THR/SER/ILE/ALA

Độ dài là 16 đến 19 gốc theo định nghĩa Kabat (theo định nghĩa AbM tận cùng là 7 gốc đầu).

HCDR3: Bắt đầu -33 các gốc sau tận cùng là CDR-H2 (hai gốc sau là CYS).

Trình tự trước là CYS-X-X (thường là CYS-ALA-ARG).

Tình tự sau là TRP-GLY-X-GLY.

Độ dài là 3 đến 25 gốc.

Tính đồng nhất của các gốc axit amin trong kháng thể đặc biệt là ngoài các CDR, nhưng dù sao cũng tạo lên một phần của điểm gắn kết bởi có chuỗi bên là một phần lớp của điểm gắn kết (nghĩa là nó là có thể sử dụng để liên kết qua điểm gắn kết), có thể được xác định nhờ sử dụng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật như mô hình hoá phân tử và tinh thể học tia X. Xem, ví dụ tài liệu Riechmann et al., (1988) *Nature*, 332::323-327.

Các kháng thể dạng khảm là các kháng thể trong đó một hoặc nhiều vùng của kháng thể bắt nguồn từ một loài động vật và một hoặc nhiều vùng của kháng thể bắt nguồn từ một loài động vật khác nhau. Kháng thể dạng khảm được ưu tiên là kháng thể bao gồm nhiều vùng bắt nguồn từ globulin miễn dịch của động vật linh trưởng. Kháng thể người dạng khảm để sử dụng trong y học cho người thường được hiểu là có các vùng biến đổi từ động vật không phải là người, ví dụ, động vật gặm nhấm, với các vùng ổn định từ người. Trái lại, kháng thể được làm tương thích với người sử dụng các CDR từ kháng thể không phải của người với phần lớn hoặc tất cả các vùng khung biến đổi từ và tất cả các vùng ổn định từ globulin miễn dịch người. Kháng thể dạng khảm thường được hiểu là có các vùng biến đổi từ động vật gặm nhấm. Kháng thể dạng khảm người thông thường có các vùng ổn định chuỗi nặng người và các vùng ổn định chuỗi nhẹ người với các vùng biến đổi của cả nhẹ và nặng bắt đầu từ kháng thể của động vật gặm nhấm. Kháng thể dạng khảm người có thể bao gồm một số thay đổi so với trình tự axit amin nguyên thể của các vùng ổn định người và trình tự vùng biến đổi chuột nguyên thể. Các kháng thể dạng khảm và được làm tương thích với người có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm các phương pháp ghép (xem, ví dụ các patent Mỹ số 5,843,708; 6,180,370; 5,693,762; 5,585,089 và 5,530,101), các cách sắp xếp lại chuỗi (xem, ví dụ patent Mỹ số 5,565,332; Rader et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* (1998)

95:8910-8915), các cách mô hình hoá phân tử (patent Mỹ số 5,639,641), và các phương pháp tương tự.

Thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với người" như được sử dụng ở đây trong trường hợp là kháng thể hai chuỗi là kháng thể trong đó ít nhất một chuỗi được làm tương thích với người. Chuỗi kháng thể được làm tương thích với người có vùng biến đổi trong đó một hoặc nhiều vùng khung là người. Kháng thể được làm tương thích với người mà là chuỗi đơn là kháng thể trong đó chuỗi có vùng biến đổi mà một hoặc nhiều vùng khung là người. Các phần không phải của người của vùng biến đổi của chuỗi kháng thể được làm tương thích với người hoặc phần của chúng thu được từ nguồn không phải là người, cụ thể là kháng thể không phải của người, thường có nguồn gốc từ động vật gặm nhấm. Phần đóng góp không phải người cho kháng thể được làm tương thích với người thường được tạo ra dưới dạng ít nhất một vùng CDR được đặt rải rác trong các vùng khung thu được từ một (hoặc nhiều) (các) globulin miễn dịch người. Ngoài ra, các gốc hỗ trợ khung có thể được biến đổi để bảo toàn ái lực gắn kết.

Kháng thể được làm tương thích với người có thể còn nhiều vùng ổn định (ví dụ ít nhất một vùng ổn định hoặc một phần của chúng, đối với trường hợp là chuỗi nhẹ, và tốt hơn là ba vùng ổn định đối với trường hợp là chuỗi nặng). Các vùng ổn định của kháng thể được làm tương thích với người nếu thường là người.

Các phương pháp để thu được "kháng thể được làm tương thích với người" là đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ tài liệu Queen et al., Proc. Natl Acad Sci USA, 86:10029-10032 (1989), Hodgson et al., Bio/Technology, 9:421 (1991)).

"Kháng thể được làm tương thích với người" cũng có thể thu được bằng phương pháp kỹ thuật di truyền có thể tạo ra các kháng thể đa dòng tương tự người trưởng thành về ái lực ở các động vật lớn, ví dụ như thỏ và chuột. Xem, ví dụ patent Mỹ số 6,632,976.

Thuật ngữ vùng ổn định (CR) như được sử dụng ở đây đề cập đến các gen vùng ổn định của globulin miễn dịch. Các gen vùng ổn định mã hoá phần của phân tử kháng thể tạo ra các chức năng tác động. Đối với các kháng thể người dạng khảm và các kháng thể được làm tương thích với người, thông thường các vùng ổn định, không phải người (ví dụ, chuột) được thay thế bằng các vùng ổn định người. Các vùng ổn định của các kháng thể dạng khảm hoặc được làm tương thích với người xem xét thường thu được từ các globulin miễn dịch người. Vùng ổn định chuỗi nặng có thể được chọn từ isotyp bất kỳ nào trong số năm isotyp: alpha, delta, epsilon, gama hoặc mu. Ngoài ra, các chuỗi nặng của các phân lớp (như các phân lớp IgG của các chuỗi nặng) tạo ra các chức năng tác động khác biệt và vì vậy bằng cách chọn vùng ổn định chuỗi nặng mong muốn, các kháng thể với chức năng tác động mong muốn có thể được tạo ra. Các vùng ổn định có thể được sử dụng trong phạm vi của sáng chế này là gama 1 (IgG1), cụ thể là vùng Fc của isotyp gama 1 (IgG1), gama 3 (IgG3) và đặc biệt là gama 4 (IgG4). Vùng ổn định chuỗi nhẹ có thể là loại kappa hoặc lambda, tốt hơn là loại kappa. Theo một phương án, vùng ổn định chuỗi nhẹ là chuỗi ổn định kappa người (Heiter et al. (1980) Cell 22:197-207) và chuỗi ổn định nặng là chuỗi ổn định người IgG4.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" cũng đã được biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và đề cập đến kháng thể là sản phẩm chứa tế bào tạo kháng thể vô tính đơn. Các kháng thể đơn dòng thường được tạo ra bằng cách hợp nhất tế bào B tạo ra kháng thể, tồn tại trong một thời gian ngắn bình thường với tế bào sinh trưởng nhanh, như tế bào ung thư (đôi khi được đề cập tới như là tế bào "bất tử"). Tế bào lai thu được, hoặc khối tế bào lai, tăng lên nhiều lần nhanh chóng, tạo ra dòng vô tính có thể sản sinh kháng thể.

Đối với mục đích của sáng chế, "kháng thể đơn dòng" cũng cần được hiểu rằng bao gồm các kháng thể được tạo ra bởi dòng vô tính gốc chưa đạt tới tính đơn dòng hoàn toàn.

Thuật ngữ "Kháng thể tương đương chức" được hiểu nằm trong phạm vi của sáng chế đề cập đến kháng thể về cơ bản có cùng ít nhất một đặc tính chức năng quan trọng với kháng thể nêu trên và được mô tả ở đây bao gồm: tính đặc hiệu gắn kết với protein dạng tinh bột β , đặc biệt với protein $A\beta_{1-42}$, và đặc biệt hơn là với vùng epitop 16-21 của protein $A\beta_{1-42}$, tính phản ứng miễn dịch *in vitro*, ức chế sự tích tụ của các chất đơn phân $A\beta_{1-42}$ thành các sợi mảnh rất nhỏ polyme phân tử cao và/hoặc chống tích tụ các sợi mảnh rất nhỏ polyme $A\beta_{1-42}$ đã hình thành trước, và/ hoặc đặc tính làm gãy tấm β và làm giảm bớt các tác động của chúng thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng tinh bột bao gồm thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng, khi được sử dụng phòng ngừa hoặc điều trị. Các kháng thể có thể là lớp bất kỳ như IgG, IgM, hoặc IgA, v.v.. hoặc phân lớp bất kỳ nào như IgG1, IgG2a, v.v.. và các phân lớp khác nêu trên hoặc đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng đặc biệt là lớp IgG2. Ngoài ra, các kháng thể có thể được tạo ra bởi phương pháp bất kỳ nào, như biểu thị thể thực khuẩn, hoặc được tạo ra trong sinh vật hoặc dòng tế bào bất kỳ nào, kể cả vi khuẩn, côn trùng, động vật có vú hoặc loại khác của tế bào hoặc dòng tế bào có thể tạo ra các kháng thể với các đặc tính mong muốn, như các kháng thể được làm tương

thích với người. Các kháng thể có thể cũng được tạo ra bằng cách kết hợp phần Fab và vùng Fc của loài khác nhau.

Thuật ngữ "lai" như được sử dụng ở đây đề cập đến các điều kiện lai thông thường, tốt hơn là các điều kiện lai tại đó dung dịch 5xSSPE, 1%SDS, 1xDenhardt được sử dụng làm dung dịch và/hoặc nhiệt độ lai nằm trong khoảng 35°C và 70°C, tốt hơn là 65°C. Sau khi lai, tốt hơn quá trình rửa được tiến hành lần thứ nhất bằng dung dịch 2xSSC, 1% SDS và rồi sau đó bằng 0,2xSSC ở nhiệt độ lai nằm trong khoảng 35°C và 70°C, tốt hơn là ở 65°C (liên quan đến định nghĩa dung dịch SSPE, SSC và Denhardt xem tài liệu Sambrook et al. loc. cit.). Các điều kiện lai nghiêm ngặt, ví dụ như được mô tả trong tài liệu Sambrook et al, supra, đặc biệt được ưu tiên. Các điều kiện lai nghiêm ngặt đặc biệt được ưu tiên, ví dụ có thể nếu quá trình lai và rửa xuất hiện ở 65°C như nêu trên. Các điều kiện lai không nghiêm ngặt, ví dụ với quá trình lai và rửa xuất hiện ở 45°C hoặc thấp hơn được ưu tiên và ở 35°C hoặc thậm chí thấp hơn.

Thuật ngữ "độ tương đồng" giữa hai trình tự được xác định bằng tính tương đồng về trình tự. Nếu hai trình tự được so sánh với nhau khác nhau về độ dài, thì tốt hơn tính tương đồng về trình tự đề cập đến tỷ lệ gốc nucleotit của trình tự ngắn hơn tương đồng với các gốc nucleotit của trình tự dài hơn. Tính tương đồng trình tự có thể được xác định thông thường bằng cách sử dụng các chương trình máy tính như chương trình Bestfit (Wisconsin Sequence Analysis Package, Version 8 for Unix, Genetics Computer Group, University Research Park, 575 Science Drive Madison, WI 53711). Bestfit sử dụng thuật toán tương đồng cục bộ của Smith and Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, để tìm ra đoạn có tính đồng nhất trình tự cao nhất giữa hai trình tự. Khi sử dụng chương trình Bestfit hoặc chương trình sắp xếp trình tự khác để xác định có hay không trình tự đặc biệt có độ tương đồng 95% chẳng hạn với trình tự tham khảo theo sáng chế, tốt hơn là các thông số được điều chỉnh đến mức tỷ lệ tương đồng được tính toán nhờ độ dài hoàn toàn của trình tự tham khảo và các thiếu hụt tương đồng lên đến 5% tổng số các nucleotit trong trình tự tham

khảo được thừa nhận. Khi sử dụng chương trình Bestfit, tốt hơn cái gọi là các thông số tùy ý để tại các giá trị điều chỉnh trước của chúng ("mặc định"). Các độ chênh xuất hiện khi so sánh giữa trình tự đã cho và các trình tự mô tả ở trên theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách bổ sung, làm khuyết đoạn, thay thế, xen đoạn hoặc tái tổ hợp. Tốt hơn là quá trình so sánh trình tự còn có thể được tiến hành bằng chương trình "fasta20u66" (version 2.0u66, September 1998 by William R. Pearson and the University of Virginia; cũng xem tài liệu W. R. Pearson (1990), *Methods in Enzymology* 183, 63-98, các ví dụ kèm theo và <http://workbench.sdsc.edu/>). Đối với mục đích này, các điều chỉnh thông số "mặc định" có thể được sử dụng.

Kháng thể theo sáng chế có thể là một globulin miễn dịch hoặc kháng thể, được hiểu rằng có từng điểm gắn kết trong các điểm gắn kết của nó giống hệt (nếu là chất nhiều tác dụng) hoặc, theo cách khác, có thể là "kháng thể đặc hiệu kép" hoặc "kháng thể chức năng kép".

Thuật ngữ "kháng thể đặc hiệu kép" hoặc "kháng thể chức năng kép" là kháng thể lai nhân tạo có hai cặp chuỗi nặng/nhẹ khác nhau và hai điểm gắn kết khác nhau. Kháng thể đặc hiệu kép có thể được tạo ra bằng cách các phương pháp khác nhau bao gồm hợp nhất các tế bào lai hoặc liên kết các phần Fab. Xem, ví dụ Songsivilai & Lachmann, *Clin. Exp. Immunol.* 79:315-321 (1990); Kostelny *et al*, *J. Immunol.* 148, 1547-1553 (1992).

Thuật ngữ "phần" đề cập đến phần hoặc tỷ lệ của kháng thể hoặc chuỗi kháng thể bao gồm không nhiều hơn một vài gốc axit amin so với chuỗi kháng thể hoặc kháng thể nguyên vẹn hoặc hoàn chỉnh. Các phần có thể thu được nhờ xử lý hoá học hoặc enzym chuỗi kháng thể hoặc kháng thể nguyên vẹn hoặc hoàn chỉnh. Các phần cũng có thể thu được bằng cách tái tổ hợp. Các phần ví dụ bao gồm các phần Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc và/hoặc Fv. Thuật ngữ "phần gắn kết kháng nguyên" đề cập đến phần polypeptit của một globulin miễn dịch hoặc kháng thể gắn kết với kháng nguyên hoặc cạnh tranh với kháng thể nguyên vẹn

(tức là với kháng thể nguyên vẹn mà từ đó chúng thu được) về gắn kết kháng nguyên (tức là gắn kết đặc hiệu).

Các phần gắn kết được tạo ra bằng các kỹ thuật tái tổ hợp AND, hoặc bằng cách phân giải enzym hoặc hoá học các globulin miễn dịch. Các phần gắn kết bao gồm các chuỗi đơn, Fab, Fab', F(ab')₂, Fabc, Fv, và các kháng thể chuỗi đơn.

Thuật ngữ "phần" cũng đề cập đến peptit hoặc polypeptit bao gồm một trình tự axit amin của ít nhất 5 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 10 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 15 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 20 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 25 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 40 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 50 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 60 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 70 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 80 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 90 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 100 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 125 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 150 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 175 gốc axit amin kề nhau, ít nhất 200 các gốc axit amin kề nhau, hoặc ít nhất 250 các gốc axit amin kề nhau của trình tự axit amin của polypeptit khác. Theo một phương án đặc biệt, phần của polypeptit giữ lại được ít nhất một chức năng của polypeptit.

Thuật ngữ "kháng nguyên" đề cập đến thực thể hoặc phần của chúng có thể gắn kết với kháng thể. Thuật ngữ chất sinh miễn dịch đề cập đến kháng nguyên có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch ở sinh vật, đặc biệt là động vật, đặc biệt hơn là ở động vật có vú bao gồm người. Thuật ngữ kháng nguyên bao gồm các vùng đã biết như các yếu tố xác định kháng nguyên hoặc các epitop đề cập đến tỷ lệ kháng nguyên tiếp xúc hoặc thể hiện vai trò đáng kể trong việc hỗ trợ gốc tiếp xúc ở kháng nguyên tạo ra tính kháng nguyên hoặc các yếu tố xác định kháng nguyên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "hoà tan" có nghĩa là hoà tan một phần hoặc hoàn toàn trong dung dịch nước.

Cũng như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "tạo miễn dịch" đề cập đến các chất tạo ra hoặc tăng cường sản sinh các kháng thể, các tế bào T và các tế bào miễn dịch phản ứng khác trực tiếp chống lại kháng nguyên của chất sinh miễn dịch.

Đáp ứng miễn dịch xuất hiện khi cá thể tạo ra các kháng thể, các tế bào T và các tế bào miễn dịch phản ứng khác đủ để chống lại các chế phẩm tạo miễn dịch được cung cấp theo sáng chế làm nhẹ hoặc giảm bớt rối loạn cần điều trị.

Thuật ngữ tính sinh miễn dịch như được sử dụng ở đây đề cập đến tiêu chuẩn đánh giá khả năng của kháng nguyên để tạo ra đáp ứng miễn dịch (thể dịch hoặc tế bào) khi cung cấp cho người nhận. Sáng chế liên quan đến phương pháp để làm giảm tính sinh miễn của các kháng thể dạng khảm hoặc được làm tương thích với người ở người.

Kháng thể được làm tương thích với người có tính sinh miễn dịch giảm đề cập đến kháng thể được làm tương thích với người thể hiện tính sinh miễn dịch giảm so với kháng thể gốc, ví dụ kháng thể chuột.

Kháng thể được làm tương thích với người về cơ bản vẫn giữ các đặc tính gắn kết của kháng thể gốc đề cập đến kháng thể được làm tương thích với người vẫn giữ được gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên được nhận dạng bởi kháng thể gốc sử dụng để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người này. Tốt hơn là kháng thể được làm tương thích với người sẽ có ái lực gắn kết kháng nguyên và ái lực tương tự hoặc về cơ bản tương tự như kháng thể gốc. Một cách lý tưởng, ái lực của kháng thể sẽ không ít hơn 10% ái lực kháng thể gốc, tốt hơn nữa là khoảng 30%, và tốt nhất là ái lực sẽ không ít hơn 50% kháng thể gốc. Các phương pháp để thử nghiệm ái lực gắn kết kháng nguyên là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm các thử nghiệm gắn kết bán toàn diện, các thử nghiệm cạnh tranh và phân tích Scatchard. Các thử nghiệm gắn kết kháng nguyên thích hợp được mô tả trong sáng chế này.

Thuật ngữ "đột biến ngược" là đột biến được đưa vào trình tự nucleotit mã hoá kháng thể được làm tương thích với người, đột biến làm cho axit amin tương ứng với axit amin ở kháng thể gốc (ví dụ kháng thể cho, ví dụ kháng thể chuột). Một số gốc khung từ kháng thể gốc có thể được duy trì trong quá trình làm tương thích với người của các kháng thể theo sáng chế để về cơ bản vẫn giữ các đặc tính gắn kết của kháng thể gốc, trong khi đồng thời tối thiểu hoá tính sinh miễn dịch hiệu nghiệm của kháng thể thu được. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể gốc có nguồn gốc từ chuột. Các ví dụ về các gốc khung có thể đột biến ngược bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các gốc hợp với quy tắc tiêu chuẩn, các gốc bao gói bề mặt, các gốc gốc bất thường gần với điểm gắn kết, các gốc ở "Vernier Zone" (tạo ra nền trên đó các CDR trú tạm) (Foote & Winter, 1992, *J. Mol. Biol.* 224, 487-499), và gốc gần với CDR H3.

Như được sử dụng ở đây thuật ngữ "thay đổi bảo toàn" đề cập đến biến đổi về cơ bản cấu hình hoặc tính trung lập kháng nguyên, tạo ra các thay đổi tối thiểu ở cấu trúc thứ ba của các polypeptit đột biến, hoặc tạo ra các thay đổi tối thiểu ở các yếu tố xác định kháng nguyên của các polypeptit đột biến tương ứng, khi so sánh với protein nguyên thể. Khi đề cập đến các kháng thể và các phần kháng thể theo sáng chế, thay đổi bảo toàn có nghĩa là thay thế axit amin không làm cho kháng thể không thể gắn kết với thụ thể đối tượng. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể dự đoán các thay thế axit amin nào có thể được tạo ra trong khi duy trì được xác suất cao về cấu hình hoặc tính trung lập kháng nguyên. Chỉ dẫn này được đề xuất, ví dụ trong tài liệu Berzofsky, (1985) *Science* 229:932-940 và Bowie et al. (1990) *Science* 247:1306-1310. Các nhân tố được coi là tác động đến khả năng duy trì cấu hình hoặc tính trung lập kháng nguyên bao gồm, nhưng không giới hạn ở: (a) thay thế các axit amin kỵ nước ít có khả năng tác động đến tính kháng nguyên do các gốc kỵ nước có khả năng định vị nhiều hơn ở bên trong của protein; (b) thay thế tương tự về sinh hoá, các axit amin ít có khả năng tác động đến cấu hình do axit amin được thế bất chức cấu trúc của axit amin nguyên thể; và (c) thay đổi các trình tự bảo toàn tiến triển có

thể tác động bất lợi đến cấu hình được hiểu theo nghĩa thông thường là bảo toàn đề xuất rằng các trình tự axit amin có ý nghĩa quan trọng về chức năng. Chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ có thể đánh giá các thay đổi cấu hình nhờ sử dụng các thử nghiệm đã biết rõ, như, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp cố định vi bổ trợ (Wasserman et al. (1961) *J. Immunol.* 87:290-295; Levine et al. (1967) *Meth. Enzymol.* 11:928-936) và qua các thử nghiệm gắn kết sử dụng các kháng thể đơn dòng phụ thuộc cấu hình (Lewis et al. (1983) *Biochem.* 22:948-954).

Ngoài ra, thuật ngữ "lượng có tác dụng điều trị" đề cập đến lượng kháng thể mà cung cấp cho người hoặc động vật, đủ để tạo ra hiệu quả điều trị ở người hoặc động vật này. Lượng hữu hiệu dễ dàng được xác định bởi chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật theo các phương pháp thông thường.

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ "điều trị" và "phòng ngừa" đề cập đến việc phòng ngừa sự tái phát hoặc tấn công của một hoặc nhiều triệu chứng rối loạn ở đối tượng nhờ cung cấp tác nhân điều trị hoặc phòng ngừa.

Cấu trúc của các kháng thể được làm tương thích với người

Sáng chế có thể được hiểu dễ dàng hơn bằng cách tham khảo phần mô tả chi tiết dưới đây các phương án đặc biệt. Mặc dù sáng chế được mô tả có tham khảo tới các chi tiết đặc biệt của một vài phương án nhưng các chi tiết đó sẽ không được coi là các giới hạn chống lại phạm vi của sáng chế.

Sáng chế đề xuất các phương pháp và chế phẩm mới bao gồm các kháng thể rất đặc hiệu và có hiệu quả cao có khả năng nhận dạng và gắn kết đặc hiệu với các epitop đặc hiệu từ giới hạn của các kháng nguyên tinh bột β . Theo chỉ dẫn của của sáng chế, các kháng thể có thể được đặc biệt sử dụng để điều trị bệnh bệnh thoái hoá dạng tinh bột, nhóm các bệnh và các rối loạn liên quan đến sự hình thành mảng dạng tinh bột bao gồm bệnh thoái hoá dạng tinh bột thứ phát và chứng thoái hoá dạng tinh bột liên quan đến tuổi bao gồm, nhưng không giới

hạn ở, các rối loạn thần kinh như bệnh Alzheimer (AD) và các bệnh và các tình trạng đặc trưng bởi sự mất khả năng trí nhớ liên quan đến nhận thức, ví dụ như, suy giảm nhận thức nhẹ (MCI), sa sút trí tuệ thể Lewy, hội chứng Down, chứng xuất huyết não di truyền với thoái hoá dạng tinh bột (loại Dutch); bệnh phức hợp Guam Parkinson-Dementia cũng như các bệnh khác dựa vào hoặc liên quan đến các protein tương tự dạng tinh bột như liệt trên nhân tiến triển, bệnh xơ cứng rải rác; bệnh Creutzfeldt Jacob, bệnh Parkinson, sa sút trí tuệ liên quan đến HIV, ALS (xơ cứng cột bên teo cơ), viêm cơ thể vùi (IBM), bệnh tiểu đường bắt đầu tuổi trưởng thành; thoái hoá dạng tinh bột tim lão suy; các khối u nội tiết, và các bệnh khác, kể cả bệnh thoái hoá điểm vàng, được gọi tên chính xác một vài bệnh.

Vùng biến đổi được làm tương thích với người hoàn toàn hoặc tạo hình lại theo sáng chế có thể được tạo ra trong phạm vi của sáng chế trước tiên bằng cách thiết kế trình tự axit amin vùng biến đổi chứa các CDR không phải của người, đặc biệt thu được từ loài gặm nhấm, nhưng đặc biệt là các CDR thu được từ kháng thể chuột ACI-01-Ab7C2 (được gọi là "mC2" trong toàn bộ sáng chế và được lưu giữ 01 tháng 12 năm 2005 ở "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) tại Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest và với số hiệu lưu giữ DSM ACC2750) gắn vào các trình tự khung thu được từ người. Các CDR không phải của người, đặc biệt thu được từ loài gặm nhấm, có thể thu được từ kháng thể theo sáng chế, tạo ra tính đặc hiệu mong muốn. Vì vậy, các gốc bao gồm thiết kế vùng biến đổi tạo hình lại về cơ bản không thay đổi. Vì vậy các cải biến bất kỳ nào sẽ bị hạn chế ở mức tối thiểu và chờ đợi sát với các thay đổi về tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể. Nói cách khác, các gốc khung theo lý thuyết có thể thu được từ vùng biến đổi người bất kỳ nào.

Để tạo ra kháng thể tạo hình lại có ái lực chấp nhận được hoặc thậm chí được cải thiện, các trình tự khung người sẽ phải được chọn, nó cũng thích hợp để tạo ra vùng biến đổi tạo hình lại và để duy trì được ái lực của kháng thể.

Để đạt được mục tiêu này, phương pháp thích hợp nhất được triển khai. Như đã biết rằng các trình tự khung được sử dụng để giữ các CDR theo định hướng không gian chuẩn của chúng để tương tác với kháng nguyên, và thậm chí đôi khi các gốc khung còn tham gia vào gắn kết kháng nguyên. Phương pháp này nhằm tối thiểu hoá các thay đổi có thể tác động chống lại cấu trúc ba chiều của kháng thể bằng cách tìm thấy trình tự khung người sử dụng để tạo hình lại kháng thể từ vùng biến đổi người hầu như tương đồng hoặc tương tự với vùng biến đổi không phải của người, đặc biệt là thu được từ loài gặm nhấm. Nó cũng sẽ tối đa hoá khả năng là ái lực sẽ được duy trì ở kháng thể tạo hình lại.

Ở mức đơn giản nhất của nó, phương pháp “thích hợp nhất” bao gồm so sánh vùng V của loài gặm nhấm cho với tất cả các trình tự axit amin vùng V của người đã biết, và sau đó chọn lọc tính tương đồng nhất để tạo ra các vùng khung nhận cho các ứng dụng làm tương thích với người. Thực tế có một vài nhân khác phải được xem xét, và nó có thể ảnh hưởng đến việc chọn lựa cuối cùng các vùng khung nhận. Về mặt này, các dự báo mô hình hoá phân tử có thể được sử dụng trước khi tiến hành thử nghiệm bất kỳ nào để thử tối đa hoá ái lực của kháng thể tạo hình lại thu được. Về cơ bản, mục tiêu của việc mô hình hoá là dự đoán các gốc chính (nếu có thể) của khung người tương đồng nhất sẽ để lại ở loài gặm nhấm để thu được ái lực tốt nhất trong kháng thể tạo hình lại.

Theo một phương án của sáng chế, các CDR có thể thu được từ kháng thể đơn dòng chuột, cụ thể là từ kháng thể đơn dòng chuột ACI-01-Ab7C2 (được gọi là "mC2" trong toàn bộ sáng chế) được mô tả trong đơn EP 05 02 7092.5 nộp ngày 12.12.2005, phần mô tả của nó được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các tế bào lai FP-12H3-C2, tạo ra kháng thể đơn dòng chuột ACI-01-Ab7C2 (được gọi là "mC2" và hC2 cho kháng thể làm tương thích với người C2,

trong toàn bộ sáng chế) được lưu giữ 01 tháng 12 năm 2005 trong đơn số EP05027092.5 tại "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ở Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest Treaty và với số hiệu lưu giữ DSM ACC2750.

Kháng thể chuột có thể được làm tăng chống lại cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử bao gồm một peptit kháng nguyên tương ứng với trình tự axit amin của peptit tinh bột β , cụ thể là của peptit tinh bột β $A\beta_{1-15}$, $A\beta_{1-16}$ và $A\beta_{1-16(\Delta 14)}$, được cải biến bằng gốc kỵ nước như, ví dụ axit palmitic hoặc gốc ưa nước như, ví dụ polyetylen glycol (PEG) hoặc hỗn hợp của cả hai, trong đó và gốc ưa nước và kỵ nước tương ứng, được liên kết cộng hoá trị với mỗi đầu tận cùng của peptit kháng nguyên bằng ít nhất một, đặc biệt là một hoặc hai axit amin như, ví dụ lysin, axit glutamic và xystein hoặc axit amin thích hợp bất kỳ nào khác hoặc chất tương tự axit amin có thể sử dụng như dụng cụ nối để kết hợp gốc ưa nước và kỵ nước với phần peptit. Khi PEG được sử dụng làm gốc ưa nước, các đầu tận cùng PEG được liên kết cộng hoá trị với phosphatidyletanolamin hoặc hợp chất bất kỳ nào khác thích hợp để có chức năng như thành phần neo, ví dụ để gắn vào cấu trúc kháng nguyên ở lớp kép của liposom.

Đặc biệt, kháng thể chuột có thể được làm tăng chống lại cấu trúc kháng nguyên siêu phân tử bao gồm một peptit kháng nguyên tương ứng với trình tự axit amin của peptit tinh bột β được cải biến bằng gốc ưa nước như, ví dụ gốc ưa nước polyetylen glycol (PEG) được liên kết cộng hoá trị với mỗi đầu tận cùng của peptit kháng nguyên bằng ít nhất một, đặc biệt là một hoặc hai axit amin như, ví dụ lysin, axit glutamic và xystein hoặc axit amin thích hợp bất kỳ nào khác hoặc chất tương tự axit amin có thể sử dụng như dụng cụ nối để kết hợp gốc ưa nước và kỵ nước với phần peptit. Khi PEG được sử dụng làm gốc ưa nước, các đầu tận cùng được liên kết cộng hoá trị với phosphatidyletanolamin hoặc hợp chất bất kỳ nào khác thích hợp để có chức năng như thành phần neo, ví dụ để gắn vào cấu trúc kháng nguyên ở lớp kép của liposom.

Theo một phương án của sáng chế, kháng thể dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng được đề xuất bao gồm trong vùng biến đổi ít nhất một CDR có nguồn gốc không phải người gắn vào một hoặc nhiều vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng và kết hợp với vùng ổn định thu được từ kháng thể có nguồn gốc người hoặc động vật linh trưởng, kháng thể đó dạng khảm hoặc một phần của chúng, hoặc kháng thể được làm tương thích với người hoặc một phần của chúng có khả năng nhận dạng và gắn kết đặc hiệu với peptit monome tinh bột β .

Các CDR chứa các gốc có khả năng nhất liên kết với kháng nguyên và phải được duy trì ở kháng thể tạo hình lại. Các CDR được xác định bởi trình tự theo Kabat et al, Sequence of Proteins of Immunological Interest, 5th Edition, The United States Department of Health and Human Services, The United States Government Printing Office, 1991. Các CDR được chia thành các loại hợp với quy tắc tiêu chuẩn (Chothia et al, 1989 *Nature*, 342, 877-883) trong đó các gốc chính xác định mức độ lớn của cấu hình cấu trúc của vòng CDR. Các gốc đó hầu như luôn duy trì được ở kháng thể tạo hình lại.

Trong quy trình để tạo ra kháng thể được làm tương thích với người theo sáng chế, các trình tự axit amin của chuỗi nặng C2 và các vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_H và V_K) được so với các trình tự kháng thể V_H và V_K của loài gặm nhấm trong cơ sở dữ liệu NCBI và Kabat.

Gen dòng mầm chuột thích hợp gần nhất với C2 VK là bbl, Locus MMU231201, (Schable et al, 1999). So sánh phát hiện rằng hai axit amin khác nhau từ trình tự dòng mầm này, cả hai được định vị trong CDRL1. Các kháng thể chuột trưởng thành với trình tự tương tự nhưng không giống hệt nhau, có thể được thấy. Một vài kháng thể có CDR12 giống hệt nhau và CDR13 giống hệt nhau, nhưng CDRL1 của C2 dường như là đơn nhất. So sánh với các trình tự dòng mầm người VK chứng tỏ rằng các gen từ nhóm phụ V_{KII} là thích hợp nhất

đối với C2 V_K (Cox et al, 1994). Vì vậy, C2 V_K có thể chỉ định tới trình tự MuV_KII nhóm phụ Kabat.

DPK15 cùng với vùng J người HuJ_K1 có thể được chọn lọc đối với các trình tự khung nhận đối với V_K được làm tương thích với người.

Các gốc tại bề mặt giữa các chuỗi nặng và nhẹ biến đổi được xác định (Chothia et al, 1985 *J. Mol. Biol*, 186, 651-663). Chúng được thường xuyên duy trì ở kháng thể tạo hình lại. Phe tại vị trí 87 C2 V_K chuột khác thường ở bề mặt, trong khi Tyr thông thường hơn ở nhóm phụ V_KII, chúng tỏ rằng gốc khung này là quan trọng đối với hoạt tính của kháng thể. Tyr 87 có mặt ở is C2VK dòng mầm người và được làm tương thích với người.

Vì vậy các trình tự V_K có thể được thiết kế sao cho C2HuVK1 bao gồm các CDR chuột C2 V_K với các khung từ DPK 15 và J_K1 người. Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, các gốc chuột có thể được thế ở vùng khung người tại các vị trí 45, và/hoặc 87. Trong vùng CDR2 có thể thu được từ kháng thể đơn dòng chuột nhất, cụ thể là kháng thể chuột ACI-01-Ab7C2, các thay thế axit amin có thể được tạo ra tại các vị trí Kabat 50 và/hoặc 53. Gốc 45 có thể hỗ trợ cấu hình của các CDR. Gốc 87 được định vị tại bề mặt của các miền V_H và V_K. Vì vậy các gốc này có thể quan trọng để duy trì gắn kết kháng thể.

Gen dòng mầm chuột thích hợp gần nhất với C2 V_H AF là VH7183, Locus AF 120466, (Langdon et al, 2000). So sánh với trình tự dòng mầm người V_H chúng tỏ rằng các gen từ nhóm phụ V_HIII là thích hợp nhất đối với C2 V_H. C2 V_H AF có thể được chỉ định cho nhóm phụ Kabat MuV_HIIID. Trình tự DP54 cùng với vùng J người HuJ_H6 có thể được chọn lọc để tạo ra các trình tự khung nhận cho V_H được làm tương thích với người.

So sánh phát hiện rằng có chín axit amin khác nhau giữa các trình tự C2 V_H và trình tự dòng mầm người nhận DP54 và J_H6, phần lớn được định vị trong CDRH2. Các kháng thể chuột trưởng thành với CDRH1 giống hệt nhau hoặc

tương tự (một gốc khác) hoặc với CDRH2 tương tự (một gốc khác) được thấy, nhưng không với tất cả ba CDR giống hệt với C2 V_H AF. CDRH3 của kháng thể C2 ngắn bất thường, gồm có chỉ ba gốc. Tuy nhiên, các kháng thể khác được thấy trong cơ sở dữ liệu với CDRH3 có độ dài này. Gốc 47 của C2 V_H là Leu thay vì Trp thông thường hơn, và gốc 94 là Ser thay vì Arg thông thường, chứng tỏ rằng các gốc khung đó có thể quan trọng đối với hoạt tính kháng thể.

Các trình tự được làm tương thích với người khác nhau V_H có thể được thiết kế. C2HuVH1 bao gồm các CDR C2 V_H AF với các khung từ DP54 và HuJ_H6. Theo một phương án đặc biệt của sáng chế, các gốc chuột có thể được thể ở vùng khung người tại các vị trí 47 hoặc 94 hoặc cả hai. Gốc 47 ở khung 2 tạo ra cả hai tiếp xúc với các CDR và với miền VK. Gốc 94 có thể tạo ra sự hỗ trợ cấu hình của các CDR. Vì vậy các gốc đó có thể là quan trọng để duy trì gắn kết kháng thể.

Các vùng khác nhau HCVR và LCVR có thể được thiết kế bao gồm các CDR không phải người có thể thu được từ kháng thể cho, ví dụ kháng thể chuột, gắn vào các vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng cải biến hoặc nguyên thể. Quá trình cải biến có thể đặc biệt liên quan đến sự trao đổi một hoặc nhiều các gốc axit amin trong vùng khung bằng các gốc không phải là người, đặc biệt là các gốc chuột, thông thường hơn được thấy ở vị trí này trong các nhóm phụ tương ứng bằng các gốc có các đặc tính tương tự với các gốc thường thấy ở vị trí này của các nhóm phụ tương ứng.

Quá trình cải biến vùng khung thì các trình tự khung được sử dụng để giữ các CDR theo định hướng không gian chuẩn của chúng để tương tác với kháng nguyên, và gốc khung này thậm chí đôi khi có thể tham gia vào gắn kết kháng nguyên. Theo một phương án của sáng chế, các biện pháp được tiến hành để làm tương thích hơn các trình tự khung người chọn lọc để làm cho chúng hầu như tương tự với các trình tự của các khung của loài gặm nhấm để tối đa hoá khả năng rằng ái lực sẽ được giữ lại ở kháng thể tạo hình lại.

Vì vậy, các gốc chuột ở vùng khung người có thể được thay thế. Đặc biệt, các gốc chuột có thể được thay thế ở vùng khung người của vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) tại các vị trí 47 hoặc 94 hoặc cả hai và ở vùng khung người của vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) tại các vị trí 45 và/hoặc 87. Trong vùng CDR2 có thể thu được từ kháng thể đơn dòng chuột nhất, cụ thể là kháng thể chuột ACI-01-Ab7C2, các thay thế axit amin có thể được tạo ra tại các vị trí Kab 50 và/hoặc 53.

Các gốc được thấy ở các vị trí biểu thị ở trên ở vùng khung người có thể được trao đổi bằng các gốc chuột thường được thấy nhiều hơn ở vị trí này trong các nhóm phụ tương ứng. Đặc biệt, Trp ở vị trí Kabat 47 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nặng như thể hiện trong SEQ ID NO:15 có thể được thay thế bằng Leu hoặc bằng gốc axit amin có các đặc tính tương tự và thay thế đó dẫn đến các biến đổi là trung tính về cơ bản cấu hình hoặc kháng nguyên, tạo ra các thay đổi tối thiểu ở cấu trúc thứ ba của các polypeptit đột biến, hoặc tạo ra các thay đổi tối thiểu ở các chất xác định kháng nguyên. Đặc biệt, Trp ở vị trí Kabat 47 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nặng như thể hiện trong SEQ ID NO:15 có thể còn được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm có norleuxin, Ile, Val, Met, Ala, và Phe, cụ thể bằng Ile. Các thay thế bảo toàn khác có thể dự tính là trung tính về cấu hình hoặc kháng nguyên.

Arg ở vị trí Kabat 94 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nặng như thể hiện trong SEQ ID NO:15 có thể được thay thế bằng Ser hoặc bằng gốc axit amin có các đặc tính tương tự và thay thế đó dẫn đến các biến đổi là trung tính về cơ bản cấu hình hoặc kháng nguyên, tạo ra các thay đổi tối thiểu ở cấu trúc thứ ba của các polypeptit đột biến, hoặc tạo ra các thay đổi tối thiểu ở các chất xác định kháng nguyên. Đặc biệt, Arg ở vị trí Kabat 94 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nặng như thể hiện trong SEQ ID NO:15 có thể còn được thay thế bằng Thr.

Theo một phương án khác của sáng chế, cả hai gốc có thể được thay thế ở kháng thể được làm tương thích với người.

Gln ở vị trí Kabat 45 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như thể hiện trong SEQ ID NO:12 có thể được thay thế bằng Lys hoặc bằng gốc axit amin có các đặc tính tương tự và thay thế đó dẫn đến các biến đổi là trung tính về cơ bản cấu hình hoặc kháng nguyên, tạo ra các thay đổi tối thiểu ở cấu trúc thứ ba của các polypeptit đột biến, hoặc tạo ra các thay đổi tối thiểu ở các chất xác định kháng nguyên. Đặc biệt, Gln ở vị trí Kabat 45 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như thể hiện trong SEQ ID NO:12 có thể được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm có Arg, Gln, và Asn, cụ thể là bằng Arg.

Leu ở vị trí Kabat 50 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như thể hiện trong SEQ ID NO:12 có thể được thay thế bằng Lys hoặc bằng gốc axit amin có thể được thay thế bằng Lys hoặc bằng gốc axit amin có các đặc tính tương tự và thay thế đó dẫn đến các biến đổi là trung tính về cơ bản cấu hình hoặc kháng nguyên, tạo ra các thay đổi tối thiểu ở cấu trúc thứ ba của các polypeptit đột biến, hoặc tạo ra các thay đổi tối thiểu ở các chất xác định kháng nguyên. Đặc biệt, Leu ở vị trí Kabat 50 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như thể hiện trong SEQ ID NO:12 có thể được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm có Arg, Gln, và Asn, cụ thể là bằng Arg.

Asn ở vị trí Kabat 53 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như thể hiện trong SEQ ID NO:12 có thể được thay thế bằng His và Gln hoặc bằng gốc axit amin có các đặc tính tương tự và thay thế đó dẫn đến các biến đổi là trung tính về cơ bản cấu hình hoặc kháng nguyên, tạo ra các thay đổi tối thiểu ở cấu trúc thứ ba của các polypeptit đột biến, hoặc tạo ra các thay đổi tối thiểu ở các chất xác định kháng nguyên.

Đặc biệt, Asn ở vị trí Kabat 53 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như thể hiện trong SEQ ID NO:12 có thể được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm có Gln, His, Lys và Arg.

Thr ở vị trí Kabat 87 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như thể hiện trong SEQ ID NO:12 có thể được thay thế bằng Phe hoặc bằng gốc axit amin có các đặc tính tương tự và thay thế đó dẫn đến các biến đổi là trung tính về cơ bản cấu hình hoặc kháng nguyên, tạo ra các thay đổi tối thiểu ở cấu trúc thứ ba của các polypeptit đột biến, hoặc tạo ra các thay đổi tối thiểu ở các chất xác định kháng nguyên. Đặc biệt, Tyr ở vị trí Kabat 87 trong vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng của vùng biến đổi chuỗi nhẹ như thể hiện trong SEQ ID NO:12 có thể được thay thế bằng axit amin được chọn từ nhóm gồm có Leu, Val, He, và Ala, cụ thể bằng Leu.

Vùng biến đổi thu được như vậy bao gồm ít nhất một CDR có nguồn gốc không phải người gắn vào trong một hoặc nhiều vùng khung thu được từ người hoặc động vật linh trưởng sau đó có thể được kết hợp với vùng ổn định thu được từ kháng thể có nguồn gốc người hoặc động vật linh trưởng, cụ thể là với các vùng ổn định người IgG4 hoặc K tương ứng. Vùng ổn định IgG4 có thể được cải biến bằng, ví dụ thay đổi Serin tại vị trí 228 ở vùng bản lề cho Prolin (HuIgG4 Ser-Pro). Đột biến này làm ổn định liên kết trong disulfua và ngăn chặn sự hình thành của một nửa các phân tử có thể xuất hiện trong các chế phẩm người nguyên thể IgG4. Vùng ổn định IgG4 có thể còn được cải biến bằng cách làm khuyết đoạn Lys tận cùng ở vị trí 439 như thể hiện trong SEQ ID NO:16.

Các vùng biến đổi cải biến có thể được cấu trúc bằng phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như, ví dụ tái tổ hợp chồng lên nhau PCR. Các cassette biểu hiện đối với kháng thể dạng khảm, C2 ChV_H AF và C2 ChV_K, có thể được sử dụng làm các mẫu để phát sinh đột biến của các vùng khung cho các trình tự

cần thiết. Các bộ của các cặp đoạn mỗi đột biến được tổng hợp bao gồm các vùng được biến đổi. Các catxet biểu hiện V_H và V_K được làm tương thích với người có thể được tách dòng vào các vật truyền tách dòng thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật như, ví dụ pUC19. Sau đó trình tự AND hoàn chỉnh được khẳng định là chuẩn đối với mỗi V_H và V_K , các gen vùng V chuỗi nặng và nhẹ cải biến có thể được cắt bỏ khỏi vật truyền tách dòng thành các catxet biểu hiện. Sau đó chúng có thể được chuyển tới các vật truyền biểu hiện thích hợp như pSVgpt và pSVhyg đó bao gồm các vùng ổn định người IgG4 Ser-Pro hoặc κ tương ứng.

Các vật truyền biểu hiện

Vật truyền biểu hiện pSVgpt gốc pSV₂gpt (Mulligan and Berg, 1980) và bao gồm gen kháng ampicilin để chọn lọc các tế bào vi khuẩn, gen gpt để chọn lọc các tế bào động vật có vú, vùng tăng cường globulin miễn dịch chuỗi nặng, trình tự hệ gen mã hoá gen vùng ổn định và các trình tự SV40 poly A. Vùng biến đổi chuỗi nặng để biểu hiện được xen đoạn là HindIII với đoạn BamHI.

Vật truyền biểu hiện pSVhyg bao gồm gen kháng ampicilin để chọn lọc các tế bào vi khuẩn, gen hyg để chọn lọc các tế bào động vật có vú, vùng tăng cường globulin miễn dịch chuỗi nặng, trình tự hệ gen mã hoá gen vùng ổn định kappa và bao gồm gen tăng cường kappa và các trình tự SV40 poly A. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ để biểu hiện được xen đoạn là HindIII với đoạn BamHI.

Trình tự AND sau đó được khẳng định là chuẩn đối với V_H và V_K được làm tương thích với người trong các vật truyền biểu hiện.

Để tạo ra kháng thể, các vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ và nặng được làm tương thích với người có thể được đưa vào các dòng tế bào sản sinh thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật như, ví dụ các tế bào NS0. Việc đưa các vật truyền biểu hiện có thể được thực hiện bằng cách đồng chuyển nhiễm bằng điện xung hoặc kỹ thuật biến đổi thích hợp bất kỳ nào khác trong lĩnh vực kỹ thuật. Các dòng tế bào sản sinh kháng thể sau đó có thể được chọn lọc và mở rộng và các

kháng thể được làm tương thích với người được tinh chế. Sau đó các kháng thể được tinh chế có thể được phân tích bằng các kỹ thuật chuẩn như SDS-PAGE.

Kháng thể với ái lực, tính đặc hiệu và tính ổn định cải thiện

Trình tự CDR12 ("KVSNRFS") của kháng thể chuột C2 có thể được cải biến nhẹ mà không có tác động bất lợi đến hoạt tính kháng thể. Các thay thế bảo toàn có thể được tạo ra nhờ trao đổi R cho K tại vị trí 50 và S cho N tại vị trí 53. Vì vậy, hai trình tự khác CDRL2 là "RVSNRFS" và "KVSSRFS" tương ứng. Chúng được đưa vào trình tự chuột V_K không có các thay đổi khác, như C2 VK-R và C2 VK-S, tương ứng.

Ái lực, tính đặc hiệu và tính ổn định của kháng thể theo sáng chế như được mô tả trên đây hoặc một phần của chúng có thể được cải biến bằng cách thay đổi profil hoặc mẫu glycosyl hoá dẫn đến cải thiện các giá trị điều trị.

Để đạt được thay đổi này trong mẫu glycosyl hoá, các tế bào chủ có thể được xử lý kỹ thuật sao cho chúng có thể biểu hiện giới hạn thích hợp của hoạt tính glycosyl transferaza được cải biến bằng glycoprotein làm tăng các oligosacarit liên kết N mang GlcNAc cắt kép. Ngoài ra, các glycoform cải biến của các glycoprotein có thể thu được, ví dụ kháng thể, bao gồm toàn bộ các phân tử kháng thể, các phần kháng thể, hoặc các protein dung hợp bao gồm vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch, có tính độc tế bào do Fc tạo ra tăng cường.

Các phương pháp để thu được các kháng thể với các mẫu glycosyl hoá cải biến là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật và được mô tả, ví dụ trong EP 1071700, US2005272128, Ferrara et al (2006) J Biol Chem 281(8), 5032-5036; Ferrara et al (2006) Biotechnology and Bioengineering 93(5), 851-861.

Dược phẩm và cách sử dụng

Các kháng thể theo sáng chế, nhưng đặc biệt là kháng thể đơn dòng theo sáng chế, có thể được điều chế dưới dạng chế phẩm có thể chấp nhận được về mặt sinh lý và có thể bao gồm chất mang dược dụng, chất pha loãng và/hoặc tá dược nhờ sử dụng các kỹ thuật đã biết. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế và như được mô tả trên đây bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng, đặc biệt, kháng thể đơn dòng bao gồm kháng thể tương đương chức bất kỳ nào hoặc các phần chức của chúng được kết hợp với chất mang dược dụng, chất pha loãng và/hoặc tá dược để bào chế dược phẩm. Các chất mang dược thích hợp, các chất pha loãng và/hoặc các tá dược là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm, ví dụ các dung dịch muối đệm phosphat, nước, nhũ tương như nhũ tương dầu/nước, các loại khác nhau của các chất làm ướt, các dung dịch tiệt trùng, v.v..

Quy trình bào chế dược phẩm theo sáng chế có thể được thực hiện theo phương pháp chuẩn đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể được cung cấp cho đối tượng dưới dạng rắn, lỏng hoặc sol khi với liều thích hợp, có tác dụng về mặt dược. Các ví dụ về các chế phẩm rắn bao gồm các viên tròn, kem và các đơn vị liều có thể cấy ghép. Các viên tròn có thể được sử dụng qua đường miệng. Kem điều trị có thể được sử dụng cục bộ. Các đơn vị liều có thể cấy ghép có thể được sử dụng khu trú, ví dụ tại điểm u, hoặc có thể được cấy ghép để giải phóng có hệ thống chế phẩm điều trị, ví dụ sử dụng dưới da. Các ví dụ về các chế phẩm lỏng bao gồm các chế phẩm thích ứng để tiêm trong cơ, dưới da, trong tĩnh mạch, trong động mạch, và các chế phẩm để sử dụng cục bộ và trong mắt. Các ví dụ về các chế phẩm sol khí bao gồm các chế phẩm xông để sử dụng cho phổi.

Các chế phẩm có thể được cung cấp bằng các cách sử dụng chuẩn. Nói chung, chế phẩm có thể được cung cấp bằng cách sử dụng khu trú, qua đường miệng, qua trực tràng, mũi, trong da, trong màng bụng, hoặc ngoài đường tiêu

hoá (ví dụ trong tĩnh mạch, dưới da, hoặc trong cơ). Ngoài ra, chế phẩm có thể được kết hợp với các chất nền giải phóng liên tục như các polyme có khả năng thoái biến sinh học, các polyme được cấy ghép trong vùng lân cận của nơi mong muốn phân phối, ví dụ tại điểm của khối u. Phương pháp bao gồm cung cấp liều đơn, cung cấp các liều nhắc lại tại các khoảng thời gian định trước, và sử dụng liên tục trong khoảng thời gian định trước.

Chất nền giải phóng liên tục, như được sử dụng ở đây, là chất nền được tạo ra từ các chất, thường là các polyme có thể thoái biến bằng cách thủy phân bằng men hoặc axit/bazơ hoặc bằng cách hoà tan. Khi xen đoạn vào cơ thể, chất nền hoạt động theo bằng các enzym và các dịch cơ thể. Chất nền giải phóng liên tục mong muốn được lựa chọn bằng các chất tương thích sinh học như các liposom, các polylactit (axit polylactit), polyglycolit (polyme của axit glycolic), polylactit co-glycolit (copolyme của axit lactic và axit glycolic), các polyanhydrit, poly(ortho)este, các polypeptit, axit hyaluronic, collagen, chondroitin sulfat, các axit carboxylic, các axit béo, các phospholipit, các polysacarit, các axit nucleic, các axit polyamin, các axit amin như phenylalanin, tyrosin, isoleuxin, các polynucleotit, polyvinyl propylen, polyvinylpyrrolidon và silicon. Chất nền có thể thoái biến sinh học được ưu tiên là chất nền của một trong số hoặc polylactit, polyglycolit, hoặc polylactit co-glycolit (co-polyme của axit lactic và axit glycolic).

Đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật thích hợp rằng liều chế phẩm sẽ tùy thuộc vào nhiều nhân tố khác nhau như, ví dụ tình trạng cần điều trị, chế phẩm cụ thể sử dụng, và các nhân tố lâm sàng khác như trọng lượng, số đo, giới tính và tình trạng sức khoẻ chung của bệnh nhân, diện tích bề mặt cơ thể, hợp chất hoặc chế phẩm cụ thể được cung cấp, các dược chất khác được sử dụng đồng thời và cách sử dụng.

Chế phẩm có thể được cung cấp kết hợp với các chế phẩm khác bao gồm chất hoặc hợp chất có hoạt tính sinh học, cụ thể là ít nhất một hợp chất được

chọn từ nhóm bao gồm các hợp chất chống lại sự mất cân bằng oxy hoá, các hợp chất chống gây chết tế bào, các chất chelat kim loại, các chất ức chế sửa chữa ADN như pirenzepin và các chất chuyển hoá, axit 3-amino-1- propanesulfonic (3 APS), 1,3-propandisulfonat (1,3PDS), các chất hoạt hóa α -secretaza, các chất ức chế β và γ -secretaza, các tau protein, các chất dẫn truyền thần kinh, các chất làm gãy tấm β , các chất dẫn dụ đối với các thành phần tế bào làm sạch/làm rộng tinh bột beta, các chất ức chế tinh bột beta làm cùn đầu tận cùng N bao gồm tinh bột beta pyroglutamat hoá 3-42, các phân tử chống viêm, "chống loạn thần kinh không điển hình" như, ví dụ clozapin, ziprasidon, risperidon, aripiprazol hoặc olanzapin hoặc các chất ức chế cholinesteraza (ChEIs) như tacrin, rivastigmin, donepezil, và/hoặc galantamin, các chất chủ vận M1 và các dược chất khác bao gồm dược chất cải biến tinh bột hoặc tau bất kỳ nào và các chất bổ sung dinh dưỡng như, ví dụ vitamin B12, xystein, tiền chất của axetylcholin, lexithin, cholin, Ginkgo biloba, axyetyl-L-carnitin, idebenon, propentofyllin, hoặc dẫn xuất xanthin, cùng với kháng thể theo sáng chế và, tùy ý, chất mang dược dụng và/hoặc chất pha loãng và/hoặc tá dược và phương pháp để điều trị bệnh các bệnh.

Chất protein có hoạt tính dược có thể có mặt với lượng trong khoảng 1ng và 10mg trên một liều. Thông thường, chế độ sử dụng sẽ nằm trong khoảng 0,1 μ g và 10mg kháng thể theo sáng chế, cụ thể là nằm trong khoảng 1,0 μ g đến 1,0mg, và đặc biệt hơn là nằm trong khoảng 1,0 μ g và 100 μ g, với số lượng liều cụ thể nằm trong phạm vi đó cũng là phần của sáng chế. Nếu việc sử dụng xuất hiện nhờ truyền liên tục liều thích hợp hơn có thể nằm trong giới hạn khoảng 0,01 μ g và 10mg đơn vị trên kilogam trọng lượng cơ thể trong một giờ với tất cả số lượng liều cụ thể nằm trong phạm vi đó cũng là phần của sáng chế.

Cách sử dụng thông thường sẽ là sử dụng ngoài đường tiêu hoá, ví dụ trong tĩnh mạch. Các chế phẩm để sử dụng ngoài đường tiêu hoá bao gồm các dung dịch nước hoặc không chứa nước tiệt trùng, huyền phù và nhũ tương. Các

dung môi không chứa nước bao gồm không giới hạn ở nó, propylen glycol, polyetylen glycol, dầu thực vật như dầu oliu, và các este hữu cơ có thể dùng để tiêm như etyl oleat. Các dung môi chứa nước có thể được chọn từ nhóm gồm có nước, các dung dịch rượu/nước, nhũ tương hoặc huyền phù bao gồm dung dịch muối và môi trường đệm. Các chất dẫn sử dụng ngoài đường tiêu hoá bao gồm dung dịch natri clorua, Ringer's dextroza, dextroza và natri clorua, Ringer's lactat hoá, hoặc các dầu không bay hơi. Các chất dẫn trong tĩnh mạch bao gồm dịch và các chất độn dinh dưỡng, các chất độn điện phân (như các loại gốc Ringer's dextroza) và các loại khác. Các chất bảo quản cũng có thể có mặt như, ví dụ các chất kháng vi khuẩn, các chất chống oxy hoá, các chất chelat hoá, các khí trơ, v.v..

Các chế phẩm được có thể còn chứa các chất mang protein như, ví dụ albumin huyết thanh hoặc globulin miễn dịch, đặc biệt là có nguồn gốc người. Các chất có hoạt tính sinh học khác có thể có mặt trong dược phẩm theo sáng chế tùy thuộc vào mục đích sử dụng của nó.

Khi đích gắn kết được định vị trong não, một vài phương án theo sáng chế đề xuất kháng thể hoặc phân hoạt tính của chúng để vượt qua hàng rào máu não. Một số bệnh thoái hoá thần kinh có liên quan đến sự gia tăng tính thấm được của hàng rào máu não, sao cho kháng thể hoặc phân hoạt tính của chúng có thể dễ dàng được đưa vào não. Nếu hàng rào máu não vẫn còn nguyên vẹn, thì một vài phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật tồn tại để chuyển các phân tử qua nó, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp vật lý, các phương pháp dựa vào lipit và các phương pháp dựa vào kênh và thụ thể.

Các phương pháp vật lý vận chuyển kháng thể hoặc phân hoạt tính của chúng qua hàng rào máu não bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phá vỡ hoàn toàn hàng rào máu não, hoặc bằng cách tạo các lỗ mở ở hàng rào máu não. Các phương pháp phá vỡ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, truyền trực tiếp vào não (xem, ví dụ tài liệu Papanastassiou et al., *Gene Therapy* 9: 398-406 (2002)) và

cấy ghép thiết bị phân phối trong não (xem, ví dụ Gill et al., *Nature Med.* 9: 589-595 (2003); và Gliadel Wafers™, Guildford Pharmaceutical). Các phương pháp để tạo các lỗ mở ở hàng rào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, siêu âm (xem, ví dụ công bố patent Mỹ No. 2002/0038086), áp suất thẩm thấu (ví dụ bằng cách cung cấp manitol ư trương (Neuwelt, E. A., *Implication of the Blood-Brain Barrier and its Manipulation*, Vols 1 & 2, Plenum Press, N. Y. (1989))), tạo thẩm thấu bằng bradykinin hoặc thiết bị tạo thẩm thấu A-7 (xem, ví dụ các patent Mỹ số 5,112,596, 5,268,164, 5,506,206, và 5,686,416), và chuyển nhiễm các tế bào thần kinh đứng trên hàng rào máu não với các vật truyền chứa các gen mã hoá kháng thể hoặc phân gắn kết kháng nguyên (xem, ví dụ Đơn yêu cầu cấp bằng patent Mỹ số 2003/0083299).

Các phương pháp dựa vào lipit để vận chuyển kháng thể hoặc phân hoạt tính của chúng vượt qua hàng rào máu não bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bao vi nang kháng thể hoặc phân hoạt tính của chúng trong các liposom có thể kết hợp với các phân gắn kết kháng thể mà có thể gắn kết với các thụ thể trên màng trong mạch của hàng rào máu não (xem, ví dụ Đơn yêu cầu cấp bằng patent Mỹ số 2002/0025313), và bao kháng thể hoặc phân hoạt tính của chúng trong các hạt lipoprotein tỷ trọng thấp (xem, ví dụ Đơn yêu cầu cấp bằng patent Mỹ số 2004/0204354) hoặc apolipoprotein E (xem, ví dụ Đơn yêu cầu cấp bằng patent Mỹ số 20040131692).

Các phương pháp dựa vào kênh và thụ thể để vận chuyển kháng thể hoặc phân của chúng qua hàng rào máu não bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng các chất phong bế glucocorticoid để làm tăng tính thẩm thấu của hàng rào máu não (xem, ví dụ các Đơn yêu cầu cấp bằng patent Mỹ số 2002/0065259, 2003/0162695 và 2005/0124533); hoạt hoá các kênh kali (xem, ví dụ Đơn yêu cầu cấp bằng patent Mỹ số 2005/0089473), ức chế các gen vận chuyển dược chất ABC (xem, ví dụ Đơn yêu cầu cấp bằng patent Mỹ số 2003/0073713); bao kháng thể bằng transferin và điều chỉnh hoạt tính của một hoặc nhiều thụ thể transferin

(xem, ví dụ Đơn yêu cầu cấp bằng patent Mỹ số 2003/0129186), và cation hoá kháng thể (xem, ví dụ patent Mỹ số 5,004,697).

Phát hiện/chẩn đoán

Theo một phương án khác, sáng chế đề xuất các phương pháp và các kit để phát hiện và chẩn đoán các bệnh hoặc các tình trạng liên quan đến tinh bột. Các phương pháp đó bao gồm các phương pháp miễn dịch đã phát thường sử dụng để phát hiện hoặc xác định số lượng các chất trong các mẫu sinh học hoặc trong tình trạng tại chỗ (*in situ*).

Việc chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng liên quan đến tinh bột ở bệnh nhân có thể đạt được nhờ phát hiện gắn kết đặc hiệu miễn dịch của kháng thể đơn dòng hoặc phân hoạt tính của chúng với epitop của protein dạng tinh bột trong mẫu hoặc hoặc *in situ*, phương pháp chẩn đoán đó bao gồm đưa mẫu hoặc phần cơ thể đặc biệt hoặc vùng cơ thể nghi ngờ chứa protein dạng tinh bột vào tiếp xúc với kháng thể gắn kết với epitop của protein dạng tinh bột, cho phép kháng thể gắn kết với protein dạng tinh bột tạo phức hệ miễn dịch, phát hiện sự hình thành của phức hệ miễn dịch và tạo tương quan sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch với sự có mặt hoặc vắng mặt của protein dạng tinh bột trong mẫu hoặc phần hoặc vùng cơ thể đặc biệt.

Các mẫu sinh học có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh hoặc tình trạng liên quan đến tinh bột là, ví dụ các chất lỏng huyết thành, huyết tương, nước bọt, các chất tiết xuất từ dạ dày, nước nhầy, dịch não tủy sống, dịch bạch huyết và các dịch tương tự hoặc các mẫu mô hoặc tế bào thu được từ cơ thể như mô thần kinh, não, tim hoặc mạch. Để xác định sự có mặt hoặc vắng mặt của protein dạng tinh bột trong mẫu, thử nghiệm miễn dịch bất kỳ nào đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật (xem tài liệu Harlow and Lane, *Antibodies: A Laboratory Manual* Cold Spring Harbor Laboratory, New York 1988 555-612) có thể được sử dụng như, ví dụ các thử nghiệm sử dụng các phương pháp phát hiện không trực tiếp nhờ sử dụng các chất phản ứng phụ trợ để dò, ELISA và các

thử nghiệm miễn dịch kết tủa và dính kết. Việc mô tả chi tiết của các thử nghiệm đó là, ví dụ được nêu trong Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế số WO96/13590 của Maertens and Stuyver, Zrein et al. (1998) và Công bố đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế số WO96/29605.

Để chẩn đoán tại chỗ, kháng thể hoặc phân hoạt tính hoặc chức của chúng có thể được cung cấp cho cơ thể cần chẩn đoán bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật như, ví dụ tiêm truyền trong tĩnh mạch, trong mũi, trong màng bụng, trong não, trong động mạch sao cho gắn kết đặc hiệu giữa kháng thể theo sáng chế với vùng epitop trên protein dạng tinh bột có thể xuất hiện. Phức hệ kháng thể/kháng nguyên có thể được phát hiện nhờ chất đồng vị đánh dấu gắn với kháng thể hoặc phân chức của chúng.

Các thử nghiệm miễn dịch sử dụng trong các ứng dụng chẩn đoán thường dựa vào các kháng nguyên, kháng thể, hoặc các chất phản ứng phụ trợ được đánh dấu để phát hiện. Các protein hoặc các chất phản ứng có thể được đánh dấu bằng các hợp chất thường đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật bao gồm các enzym, các đồng vị phóng xạ, và các chất huỳnh quang, phát quang và sinh màu bao gồm các hạt màu, như các hạt vàng keo và latec. Trong đó, việc đánh dấu phóng xạ có thể được sử dụng cho hầu như tất cả các loại thử nghiệm và với hầu hết cải biến đổi. Các chất đồng vị đánh dấu liên kết enzym đặc biệt được sử dụng khi tính phóng xạ phải được tránh hoặc khi các kết quả nhanh là cần thiết. Các chất gây huỳnh quang, mặc dù cần đến thiết bị đắt tiền để sử dụng chúng, tạo ra phương pháp rất nhạy để phát hiện. Kháng thể sử dụng trong các thử nghiệm bao gồm các kháng thể đơn dòng, các kháng thể đa dòng, và các kháng thể đa dòng tinh khiết ái lực.

Theo cách khác, kháng thể có thể được đánh dấu bằng cách phản ứng với các chất đánh dấu có ái lực đối với globulin miễn dịch, như protein A hoặc G hoặc các kháng thể thứ cấp. Kháng thể có thể được kết hợp với chất bậc hai và dò bằng chất đánh dấu thứ ba có ái lực đối với chất bậc hai kết hợp với kháng

thể. Ví dụ, kháng thể có thể được kết hợp với biotin và thể tiếp hợp kháng thể-biotin được phát hiện nhờ sử dụng avidin hoặc streptavidin đánh dấu. Tương tự, kháng thể có thể được kết hợp với hapten và thể tiếp hợp kháng thể-hapten được phát hiện nhờ sử dụng kháng thể kháng hapten đánh dấu.

Các chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật sẽ biết các chất đồng vị đánh dấu đó và khác có thể được sử dụng theo sáng chế. Việc gắn kết của các chất đồng vị đánh dấu đó với các kháng thể hoặc các phần của chúng có thể được thực hiện nhờ sử dụng các kỹ thuật chuẩn thường đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật thông thường được mô tả bởi Kennedy, J. H., *et al.*, 1976 (Clin. Chim. Acta 70:1-31), and Schurs, A. H. W. M., *et al.* 1977 (Clin. Chim. Acta 81:1-40). Các kỹ thuật kết hợp được nêu sau cùng là phương pháp glutaraldehyt, phương pháp periodat, phương pháp dimaleimit và các phương pháp khác, tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các thử nghiệm miễn dịch hiện tại sử dụng phương pháp kháng thể kép để phát hiện sự có mặt của chất phân tích trong đó. Kháng thể được đánh dấu gián tiếp bằng khả năng phản ứng với kháng thể thứ hai được đánh dấu bằng chất đồng vị đánh dấu có thể phát hiện được. Tốt hơn nếu kháng thể thứ hai là kháng thể gắn kết với kháng thể của động vật mà từ đó các kháng thể đơn dòng được tạo ra. Nói cách khác, nếu kháng thể đơn dòng là kháng thể chuột, thì kháng thể thứ hai, được đánh dấu là kháng thể kháng chuột. Đối với kháng thể đơn dòng sử dụng trong thử nghiệm được mô tả dưới đây, tốt hơn là chất đồng vị đánh dấu là hạt bao kháng thể, cụ thể là hạt từ tính. Đối với kháng thể đa dòng được sử dụng trong thử nghiệm miễn dịch được mô tả ở đây, tốt hơn là chất đồng vị đánh dấu là phân tử có thể phát hiện được như chất phóng xạ, huỳnh quang hoặc phát quang điện hoá.

Hệ kháng thể kép khác thường đề cập đến như các hệ format nhanh vì chúng thích ứng với các xác định nhanh sự có mặt của chất phân tích, có thể cũng được sử dụng trong phạm vi của sáng chế. Hệ này cần đến ái lực cao giữa

kháng thể và chất phân tích. Theo một phương án của sáng chế, sự có mặt của protein dạng tinh bột được xác định nhờ sử dụng cặp các kháng thể, mỗi cặp đặc hiệu với protein dạng tinh bột. Một trong các cặp này của các kháng thể được đề cập tới ở đây là "kháng thể dò" và cặp khác này của kháng thể được đề cập tới ở đây là "kháng thể giữ". Kháng thể đơn dòng của sáng chế có thể được sử dụng hoặc làm kháng thể giữ hoặc làm kháng thể dò. Kháng thể đơn dòng theo sáng chế còn có thể được sử dụng như hai kháng thể dò và giữ, cùng nhau trong một thử nghiệm. Vì vậy, một phương án của sáng chế sử dụng phương pháp nhiều lớp kháng thể kép để phát hiện protein dạng tinh bột trong mẫu chứa dịch sinh học. Theo phương pháp này, chất phân tích (protein dạng tinh bột) được tạo nhiều lớp giữa kháng thể dò và kháng thể giữ, kháng thể giữ được cố định không thể đảo ngược được vào chất nền rắn. Kháng thể dò sẽ chứa chất đồng vị đánh dấu có thể phát hiện được, để nhận biết sự có mặt của nhiều lớp kháng thể- chất phân tích và theo đó sự có mặt của chất phân tích.

Các chất pha rắn ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đĩa vi chuẩn độ, các ống thử nghiệm chứa polystyren, nam châm, các hạt chất dẻo hoặc thủy tinh và các lát cắt đã biết rõ trong lĩnh vực thử nghiệm chất miễn dịch phóng xạ và thử nghiệm miễn dịch enzyme. Các phương pháp để kết hợp kháng thể với các pha rắn cũng đã biết rõ đối với chuyên gia trong lĩnh vực kỹ thuật. Mới đây, một số chất xốp như nylon, nitroxenluloza, xenluloza axetat, các sợi thủy tinh và các polyme xốp khác được sử dụng như các lớp nền rắn.

Sáng chế cũng đề xuất kit chẩn đoán để phát hiện protein dạng tinh bột trong mẫu sinh học bao gồm chế phẩm như xác định ở trên. Ngoài ra, sáng chế cũng đề xuất kit chẩn đoán mới đây nhất, ngoài ra tới chế phẩm như được xác định ở trên, còn bao gồm chất phát hiện như được xác định ở trên. Thuật ngữ "kit chẩn đoán" nói chung đề cập đến kit chẩn đoán bất kỳ nào đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Đặc biệt hơn, thuật ngữ sau cùng đề cập đến kit chẩn đoán như được mô tả trong tài liệu Zrein et al. (1998).

Mục đích khác của sáng chế là đề xuất các mẫu lai thử miễn dịch và các kit thử nghiệm để phát hiện và chẩn đoán các bệnh và tình trạng liên quan đến tinh bột bao gồm kháng thể theo sáng chế. Đối với các mẫu lai thử miễn dịch, kháng thể được gắn kết trực tiếp hoặc gián tiếp với phân tử báo cáo thích hợp, ví dụ enzym hoặc chất đồng vị phóng xạ. Kit thử nghiệm bao gồm một thùng chứa một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và các tài liệu hướng dẫn để sử dụng kháng thể nhằm mục đích gắn kết với protein dạng tinh bột tạo phức hệ miễn dịch và phát hiện sự hình thành của phức hệ miễn dịch sao cho sự có mặt hoặc vắng mặt của phức hệ miễn dịch tương quan với sự có mặt hoặc vắng mặt của protein dạng tinh bột.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Nguyên liệu

Việc phát triển và điều chế các kháng thể đơn dòng chuột ACI-01-Ab7C2 (gọi là "mC2" và hC2 đối với kháng thể được làm tương thích với người C2, trong toàn bộ sáng chế) được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 05027092.5 nộp ngày 12/12/2005, phần mô tả của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các tế bào lai FP-12H3-C2, tạo ra các kháng thể đơn dòng ACI-01-Ab7C2 (gọi là "mC2" và hC2 đối với kháng thể được làm tương thích với người C2, trong toàn bộ sáng chế) được lưu giữ 01 tháng 12 năm 2005 trong Đơn yêu cầu cấp patent châu Âu số 05027092.5 tại "Deutsche Sammlung von Mikroorganismen und Zellkulturen GmbH (DSMZ) ở Braunschweig, Mascheroder Weg 1 B, 38124 Braunschweig, theo các điều khoản của Hiệp ước Budapest Treaty và với số hiệu lưu giữ DSM ACC2750.

Các tế bào được nuôi cấy trong môi trường Dulbecco's modified Eagle Medium (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò và các chất kháng sinh

(Penicillin/Streptomycin). Isotyp của kháng thể tạo ra được kiểm tra và phát hiện là IgG2b/kappa chuột, như mong đợi.

Thử nghiệm

ELISA đối với gắn kết với Amyloid Beta cung cấp một số đo đáng tin cậy về khả năng của các kháng thể C2. Kháng thể đối chứng dương tính, kháng thể chuột FP-12H3-C2 (Genovac Lot No: AK379/01), và kháng thể Chemicon chuẩn 1560 (Lot no: 0508008791).

Lựa chọn các vùng ổn định người

Như là sự bổ sung hệ miễn dịch không mong muốn đối với ứng cử kháng thể lâm sàng, vùng ổn định người chọn lọc đối với chuỗi nặng là IgG4 người, được cải biến để thay đổi Serin tại vị trí 228 ở vùng bản lề thành Prolin (HuIgG4 Ser-Pro). Đột biến này làm ổn định liên kết trong chuỗi disulfua và ngăn ngừa sự hình thành của một nửa các phân tử có thể xuất hiện trong các chế phẩm người nguyên thể IgG4. Kháng thể biểu hiện từ các dòng tế bào sản sinh cũng sẽ có lysin tận cùng được loại bỏ. Các trình tự của các vùng ổn định người HuIgG4 Ser-Pro và Kappa người được định rõ trong SEQ ID NO:17 và SEQ ID NO:14 tương ứng.

Ví dụ 1: Tách dòng và lập trình tự các vùng biến đổi kháng thể

ARN tổng được điều chế từ 3×10^6 tế bào lai (một bình thử nghiệm thót cổ T175) nhờ sử dụng kit mini Qiagen RNeasy (Cat No: 74104). ARN được rửa giải trong 50µL nước và kiểm tra bằng 1,2% gel agarosa. Môi trường điều kiện từ các tế bào được giữ lại và mẫu sử dụng để thử nghiệm trong thử nghiệm hoạt tính của kháng thể.

Các ADN bổ trợ V_H và V_K được điều chế nhờ sử dụng transcriptaza ngược với các đoạn môi vùng ổn định chuột IgG và K. Các ADN bổ trợ sợi đơn thứ nhất được khuếch đại bằng PCR nhờ sử dụng bộ lớn của các đoạn môi trình tự

tín hiệu. Các ADN bổ trợ khuếch đại được tinh chế bằng gel và tách dòng vào vật truyền pGem® T Easy (Promega). Các dòng vô tính V_H và V_K thu được được sàng lọc về các xen đoạn có kích cỡ mong đợi bằng PCR và trình tự ADN của các dòng vô tính chọn lọc được xác định bằng cách lập trình tự ADN tự động. Các vị trí của các vùng xác định bổ trợ (CDRs) trong các trình tự được xác định có liên quan đến các trình tự kháng thể khác (Kabat EA et al, 1991). Cách đánh số thông thường của Kabat đối với các vùng biến đổi kháng thể được sử dụng trong toàn bộ sáng chế này; do đó các số gốc có thể khác nhau từ số tuyến tính tuyệt đối.

Trình tự ADN và trình tự axit amin suy ra đối với mC2 V_K được thể hiện trong các trình tự SEQ ID NO:29 và SEQ ID NO:27 tương ứng. Bốn dòng vô tính tạo ra trình tự sản sinh giống hệt này. Trình tự không sản sinh khác thường V_K xuất hiện từ thanh nhiễm sắc dung hợp tế bào lai cũng được thấy ở một số dòng vô tính.

Đối với mC2 V_H , hai trình tự sản sinh khác nhau được phân lập. Trình tự mC2 V_H AF (xem SEQ ID NO:30) được thấy ở tổng số 29 dòng vô tính, với 14 thay đổi cặp bazơ đơn ở các dòng vô tính riêng biệt. Trình tự mC2 V_H B được thấy ở tổng số 8 dòng vô tính. Năm trong số đó thể hiện trình tự chủ chốt, với 3 dòng vô tính khác là các biến đổi trên đó. Có thể là các trình tự V_H B tương tự xuất hiện như là chất giả của quá trình khuếch đại PCR. V_H không sản sinh khác thường cũng thu được từ tế bào lai C2 và được cho là do liên kết thiếu sót V-D-J.

Để xác định nó có là mC2 V_H có hoạt tính chuẩn, hai kháng thể dạng khảm được tạo ra với hai trình tự khác nhau V_H , AF và B, được kết hợp với mC2 V_K , để thử nghiệm hoạt tính kháng thể chuẩn.

Ví dụ 2: Cấu trúc của các gen kháng thể dạng khảm

Kháng thể dạng khảm người dưới dạng thông thường nhất bao gồm các vùng ổn định người liên kết với các vùng biến đổi chuột (hoặc không phải là

người khác). Kháng thể dạng khảm tạo ra công cụ rất hữu ích, trước tiên để khẳng định rằng các vùng biến đổi chuẩn được nhận dạng, thứ hai để sử dụng làm kháng thể đối chứng trong các thử nghiệm gắn kết kháng nguyên với các chức năng tác động tương tự và sử dụng các chất phản ứng phát hiện thứ cấp tương tự như kháng thể được làm tương thích với người hoặc xử lý kỹ thuật, và còn được sử dụng để nghiên cứu các đặc tính động học và các đặc tính khác của các vùng ổn định người có liên quan đến đích đặc biệt của kháng thể.

Hai vật truyền biểu hiện chuỗi nặng dạng khảm được cấu trúc bao gồm các vùng biến đổi mC2 V_H AF hoặc mC2 V_H B liên kết với vùng ổn định HuIgG4 (Ser-Pro) trong vật truyền biểu hiện *pSVgpt*. Điều này dựa vào *pSV₂gpt* (Mulligan and Berg, 1980) và bao gồm gen kháng ampicilin để chọn lọc trong các tế bào vi khuẩn, gen *gpt* để chọn lọc trong các tế bào động vật có vú, vùng tăng cường globulin miễn dịch chuỗi nặng chuột, trình tự hệ gen mã hoá gen vùng ổn định và các trình tự SV40 poly A. Vùng biến đổi chuỗi nặng để biểu hiện được xen đoạn như *HindIII* vào đoạn *BamHI*.

Vật truyền chuỗi nhẹ dạng khảm được cấu trúc bao gồm C2 VK liên kết với vùng ổn định người C Kappa trong vật truyền biểu hiện *pSVhyg*. (Hieter PA *et al*, 1980) *pSVhyg* bao gồm gen kháng ampicilin để chọn lọc trong các tế bào vi khuẩn, gen *hyg* để chọn lọc trong các tế bào động vật có vú, vùng tăng cường globulin miễn dịch chuỗi nặng chuột, trình tự hệ gen mã hoá gen vùng ổn định kappa và các trình tự SV40 poly A. Vùng biến đổi chuỗi nhẹ để biểu hiện được xen đoạn như *HindIII* vào đoạn *BamHI*.

Các catxet biểu hiện cho các trình tự chuột C2 VH và VK được cấu trúc bằng cách bổ sung trình tự sườn 5' bao gồm peptit tín hiệu dẫn đầu, intron dẫn đầu và gen khởi đầu globulin miễn dịch chuột, và trình tự sườn 3' bao gồm trình tự intron và điểm tách intron, nhờ sử dụng các vật truyền VH-PCR1 và VK-PCR1 làm mẫu (Riechmann *et al.*, 1988). Trình tự ADN được khẳng định là chuẩn đối với VH và VK trong các vật truyền biểu hiện. Các trình tự ADN và axit amin của

các gen VH và VK trong các catxet biểu hiện được thể hiện trong các hình Fig.1 và Fig.2.

Ví dụ 3: Biểu hiện kháng thể dạng khảm

3.1 Biểu hiện ở các dòng tế bào ổn định

Dòng tế bào chủ để biểu hiện kháng thể là NS0, u tủy chuột tạo globulin không miễn dịch, thu được từ European Collection of Animal Cell Cultures, Porton UK (ECACC No 85110503). Các vật truyền biểu hiện chuỗi nặng và nhẹ được đồng chuyển nhiễm vào các tế bào NS0 bằng điện xung. Các khuẩn lạc biểu hiện gen *gpt* được chọn lọc trong môi trường Dulbecco's Modified Eagle (DMEM) có bổ sung 10% huyết thanh thai bò (FBS), 0,8µg/ml axit mycophenolic và 250µg/ml xanthin. Các dòng tế bào vô tính chuyển nhiễm được sàng lọc để tạo ra kháng thể người bằng ELISA cho IgG người. Các dòng tế bào tiết xuất kháng thể được mở rộng và các sinh vật tự sản xuất cao nhất được chọn lọc và làm lạnh xuống bằng nitơ lỏng. Các dòng tế bào sản sinh tốt nhất cho mỗi kháng thể được mở rộng trong môi trường như nêu trên nhưng chỉ với 5% FBS. Các kháng thể dạng khảm được tinh chế nhờ sử dụng Prosep®-A (Bioprocessing Ltd). Nồng độ được xác định bằng ELISA cho kháng thể người IgG_K. Các kháng thể cũng được phân tích bằng SDS-PAGE.

3.2 Biểu hiện tạm thời của kháng thể dạng khảm

Để tiến hành thử nghiệm các kháng thể dạng khảm, biểu hiện tạm thời được sử dụng để tạo ra rất nhanh các lượng nhỏ dịch nổi tế bào chứa kháng thể tái tổ hợp để thử nghiệm. Các cassette biểu hiện mC2 V_H và V_K được chuyển vào các vật truyền dựa vào pcDNA3.1 (Invitrogen) để biểu hiện tạm thời. Vật truyền chuỗi nặng bao gồm vùng ổn định người IgG. Vật truyền chuỗi nhẹ vùng ổn định người kappa. Cả hai mC2 V_H AF và mC2 V_H B được chuyển nhiễm với mC2 V_K vào các tế bào phôi thận người (HEK 298) với chất phản ứng Lipofectamine 2000 (Invitrogen Cat No: 11668) theo phương pháp được cung cấp bởi nhà sản

xuất. Môi trường điều kiện được thu gom từ các tế bào sau 3 ngày chuyển nhiễm. Lượng kháng thể tạo ra được xác định bằng ELISA đối với kháng thể người IgG_K.

Ví dụ 4: Hoạt tính của các kháng thể dạng khảm C2

4.1 Hoạt tính của các kháng thể dạng khảm được tạo ra bằng cách chuyển nhiễm tạm thời

Các mẫu của môi trường điều kiện từ quá trình chuyển nhiễm tạm thời đối với hai kháng thể dạng khảm khác nhau được thử nghiệm trong ELISA về sự gắn kết với tinh bột beta. Các kết quả biểu thị rõ ràng rằng C2 V_H AF là trình tự chuẩn. Kháng thể dạng khảm C2 V_H AF/C2 V_K gắn kết tốt trong thử nghiệm, nhưng C2 V_H B/C2 V_K không thể hiện bất kỳ gắn kết nào ở tất cả. Kháng thể đối chuột chuột chemicon 1560 thể hiện sự gắn kết tốt, nhưng gắn kết do kháng thể chuột tinh khiết C2 tạo ra là kém. Cần lưu ý rằng kháng thể thứ cấp khác nhau được sử dụng cho các kháng thể chuột với các vùng ổn định chuột so với các kháng thể dạng khảm với các vùng ổn định người, do đó các kết quả không thể so sánh trực tiếp. Môi trường điều kiện từ tế bào lai C2 chậm được thấy tạo ra kết quả tốt trong thử nghiệm.

4.2 Hoạt tính của kháng thể dạng khảm tinh khiết C2

Hai kháng thể dạng khảm khác nhau C2 được tinh chế từ các dòng tế bào ổn định NS0 như được mô tả và thử nghiệm nhờ sử dụng Amyloid Beta ELISA. Các kết quả thu được phù hợp với các kết quả thu được với kháng thể biểu hiện tạm thời. Kháng thể C2 ChV_H AF/ChV_K gắn kết tốt trong ELISA và kháng thể C2 ChV_H B/ChV_K không thể hiện gắn kết ở tất cả.

Ví dụ 5: Thiết kế các gen kháng thể được làm tương thích với người C2

Các trình tự axit amins mC2 V_H và V_K được so sánh với các trình tự kháng thể loài gặm nhấm V_H và V_K trong các cơ sở dữ liệu NCBI và Kabat.

5.1 Vùng biến đổi chuỗi nhẹ

Gen dòng mầm chuột thích hợp gần nhất với C2 V_K là bb1, Locus MMU231201, (Schable et al, 1999). Chỉ hai axit amin khác nhau từ trình tự dòng mầm này, cả hai được định vị trong CDRL1. Các kháng thể chuột trưởng thành với trình tự tương tự nhưng không giống hệt nhau, có thể được thấy. Một vài kháng thể có CDRL2 giống hệt nhau và CDRL3 giống hệt nhau, nhưng CDRL1 của C2 dường như là đơn nhất. mC2 V_K có thể được chỉ định là nhóm phụ Kabat MUV_KII. Các vị trí 87 của mC2 V_K là F thay vì Y là thông thường hơn trong nhóm phụ, chứng tỏ rằng gốc khung này có thể quan trọng đối với hoạt tính của kháng thể. So sánh với các trình tự dòng mầm người V_K chứng tỏ rằng các gen từ nhóm phụ V_KII là thích hợp nhất đối với C2 V_K (Cox et al, 1994). Trình tự DPK15 cùng với vùng người J HUK1 được chọn lựa để tạo ra các trình tự khung nhận của V_K được làm tương thích với người.

Bốn trình tự được làm tương thích với người V_K được thiết kế. C2HuVK1 gồm có các CDR mC2 V_K với các khung từ DPK 15 và J_K1 người. Trong các version 2, 3 và 4 các gốc chuột được thay thế ở khung tại các vị trí 45 hoặc 87 hoặc cả hai. Gốc 45 có thể tạo ra sự hỗ trợ cho cấu hình của các CDR. Gốc 87 được định vị ở bề mặt của các miền V_H và V_K. Vì vậy, các gốc đó là quan trọng để duy trì gắn kết của kháng thể. Các vị trí và thay đổi được tạo ra ở các vùng khung biến đổi chuỗi nhẹ được thể hiện trong Bảng 6. So sánh các trình tự được làm tương thích với người với trình tự mC2 V_K, và với DPK 15 và J_K1 người.

5.2 Vùng biến đổi chuỗi nặng

Gen dòng mầm chuột thích hợp gần nhất với mC2 V_H AF là VH7183, Locus AF120466, (Langdon et al., 2000). Sự so sánh được thể hiện trong Fig.3. Chín axit amin khác nhau từ trình tự dòng mầm này, hầu hết được định vị trong CDR2. Các kháng thể chuột trưởng thành với CDR1 tương tự (một gốc khác nhau) hoặc giống hệt nhau hoặc với CDR2 tương tự (một gốc khác nhau) được thấy, nhưng không với tất cả ba CDR giống hệt với mC2 V_H AF. CDR3 của

kháng thể mC2 cực kỳ ngắn, bao gồm chỉ ba gốc. Tuy nhiên, kháng thể khác được thấy trong cơ sở dữ liệu với CDR3 có độ dài này. mC2 V_H AF có thể được chỉ định cho nhóm phụ Kabat MUV_HIIID. Gốc 47 của mC2 V_H là L thay vì thường xuyên hơn là W, và gốc 94 là S thay vì thường là R, chứng tỏ rằng các gốc khung đó có thể quan trọng đối với hoạt tính của kháng thể. Việc so sánh với các trình tự dòng mầm người V_H chứng tỏ các gen từ nhóm phụ V_HIII là thích hợp đối với mC2 V_H. Trình tự DP54 cùng với vùng J HUJ_H6 được chọn lựa để tạo ra các trình tự khung nhận cho V_H được làm tương thích với người.

Bốn trình tự được làm tương thích với người V_H được thiết kế. C2HuVH1 bao gồm các CDR mC2 V_H AF với các khung từ DP54 và HUJ_H6. Trong các version 2, 3 và 4 các gốc chuột được thay thế ở khung tại các vị trí 47 hoặc 94 hoặc cả hai. Gốc 47 ở khung 2 tạo ra cả hai liên kết với các CDR và với miền V_K. Gốc 94 có thể tạo ra sự hỗ trợ cho cấu hình của các CDR. Vì vậy các gốc đó có thể là quan trọng để duy trì gắn kết kháng thể.

Các vị trí và thay đổi được tạo ra ở các vùng khung chuỗi nặng được thể hiện trong bảng 7.

Ví dụ 6: Cấu trúc của các gen kháng thể được làm tương thích với người

Các vùng biến đổi cải biến được cấu trúc bằng phương pháp tái tổ hợp chồng lợp PCR. Các cassette biểu hiện đối với kháng thể dạng khảm, C2 ChV_H AF và C2 ChV_K, được sử dụng làm các mẫu để tạo phát sinh đột biến của vùng khung tới các trình tự cần thiết. Các bộ cặp đoạn mỗi đột biến được tổng hợp bao gồm các vùng được biến đổi. Các cassette biểu hiện V_H và V_K tạo ra được tách dòng vào pUC19 và trình tự ADN hoàn thiện được khẳng định là chuẩn đối với mỗi V_H và V_K. Các gen vùng V chuỗi nặng và nhẹ cải biến được cắt bỏ khỏi pUC19 như các cassette biểu hiện *Hind*III đến *Bam*HI. Chúng được chuyển đến các vật truyền biểu hiện pSV_{gpt} và pSV_{hyg} mà bao gồm các vùng ổn định người IgG4 Ser-pro hoặc K tương ứng, như đối với các vật truyền kháng thể dạng khảm.

Trình tự AND được khẳng định là chuẩn đối với V_H và V_K được làm tương thích với người trong các vật truyền biểu hiện.

Ví dụ 7: Biểu hiện của các kháng thể được làm tương thích với người

7.1 Biểu hiện trong dòng tế bào ổn định

Các vật truyền biểu hiện chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được đồng chuyển nhiễm trong các tế bào NS0 bằng xung điện, như để biểu hiện các kháng thể dạng khảm. Các dòng tế bào tạo ra kháng thể được chọn lọc và mở rộng và các kháng thể được làm tương thích với người được tinh chế, chính xác như đối với các kháng thể dạng khảm. Các kháng thể tinh khiết được phân tích bằng SDS-PAGE.

7.2 Biểu hiện tạm thời của kháng thể được làm tương thích với người

Để tiến hành thử nghiệm các cấu trúc được làm tương thích với người khác nhau V_H và V_K , các cassette biểu hiện V_H và V_K được làm tương thích với người C2 cũng được chuyển tới các vật truyền để biểu hiện tạm thời được mô tả trong phần 7.2. Bốn cấu trúc được làm tương thích với người C2 V_K được đồng chuyển nhiễm với cấu trúc dạng khảm C2 V_H trong các tế bào HEK293. Tương tự, bốn cấu trúc được làm tương thích với người C2 V_H được đồng chuyển nhiễm với cấu trúc dạng khảm C2 V_K trong các tế bào HEK293. Môi trường điều kiện được thu gom từ các tế bào ba ngày sau khi chuyển nhiễm. Lượng kháng thể tạo ra được xác định bằng ELISA đối với kháng thể người IgGκ.

Ví dụ 8: Hoạt tính của kháng thể được làm tương thích với người C2.

8.1 Hoạt tính của kháng thể được làm tương thích với người C2 tạo ra bằng chuyển nhiễm tạm thời

Các mẫu của môi trường điều kiện từ quá trình chuyển nhiễm tạm thời được thử nghiệm trong Amyloid Beta ELISA. Các kết quả thu được biểu thị rõ ràng rằng các cấu trúc V_H được làm tương thích với người C2 HuVH AF các

version 2 và 4 có chức năng khi kết hợp với chuỗi dạng khảm C2 kappa, và có thể so sánh được với kháng thể dạng khảm C2 trong thử nghiệm. Ngược lại, kháng thể chứa C2 HuVH AF các version 1 và 3 kết hợp với chuỗi dạng khảm C2 kappa thể hiện không có gắn kết ở tất cả các thử nghiệm. Điều này chứng tỏ rằng sự thay thế gốc chuột tại vị trí 94 là cần thiết đối với hoạt tính của kháng thể. Kháng thể chứa chuỗi nặng dạng khảm C2 kết hợp với tất cả bốn chuỗi được làm tương thích với người C2 kappa thể hiện gắn kết tốt, có thể so sánh với kháng thể dạng khảm, trong ELISA.

8.2 Hoạt tính của kháng thể được làm tương thích với người tinh khiết C2

Tám kháng thể được làm tương thích với người khác nhau C2 bao gồm tất cả các tổ hợp của hai chuỗi nặng được làm tương thích với người và bốn chuỗi nhẹ được làm tương thích với người được tinh chế từ các dòng tế bào NS0 như được mô tả và thử nghiệm nhờ sử dụng Amyloid Beta ELISA (Fig.4).

Các kết quả thu được biểu thị rõ ràng rằng các kháng thể C2 HuVH4 hoạt động tốt hơn trong thử nghiệm so với kháng thể C2 HuVH2. Các kết quả của kháng thể C2 HuVH2 và C2 HuVH2/HuVK3 thể hiện hoạt tính tốt nhất, nhưng giảm khoảng 2 lần so với kháng thể đối chứng dạng khảm C2 ChVHAF/ChVK. Hoạt tính của C2 HuVH2/HuVK2 giảm từ 4 đến 5 lần so với đối chứng. Các hoạt tính của kháng thể bao gồm C2HuVH4 với bốn chuỗi nhẹ được làm tương thích với người khác nhau là tương tự. Hoạt tính cao nhất được thấy đối với C2HuVH4/HuVK1 và tất cả bốn kháng thể là gần với kháng thể đối chứng dạng khảm trong thử nghiệm.

Ví dụ 9: Các cải biến với CDR12

9.1 Thiết kế chuỗi nhẹ với CDR 2 cải biến

Như đã nêu trên, nhiều kháng thể có chung trình tự CDRL2 tương tự ("KVSNRFS") như kháng thể C2. Đã quyết định thử nghiệm xem liệu CDRL2 có thể được cải biến nhẹ mà không tác động bất lợi đến hoạt tính của kháng thể

không. Hai thay thế bảo toàn được chọn: R cho K tại vị trí 50 và S cho N tại vị trí 53. Vì vậy, hai trình tự CDRL2 khác là "RVSNRFS" và "KVSSRFS". Chúng được đưa vào trình tự chuột V_K mà không có thay đổi nào khác, như mC2 VK-R và mC2 VK-S tương ứng.

9.2 Biểu hiện tạm thời của kháng thể CDRL2 cải biến

Hai cấu trúc chuỗi nhẹ C2 với CDRL2 cải biến mô tả ở phần 11.2.1 được tách dòng vào vật truyền chuỗi nhẹ để biểu hiện tạm thời. Mỗi cấu trúc được đồng chuyển nhiễm với vật truyền dạng khảm C2 V_H trong các tế bào HEK293. Môi trường điều kiện được thu gom từ các tế bào ba ngày sau khi chuyển nhiễm. Lượng kháng thể tạo ra được xác định bằng ELISA cho kháng thể IgG_K người.

9.3 Hoạt tính của kháng thể C2 với CDRL2 cải biến

Các mẫu của môi trường điều kiện từ quá trình chuyển nhiễm tạm thời mC2 V_KS với CDRL2 cải biến được kết hợp với mC2 V_H được thử nghiệm trong ELISA tinh bột beta (Fig.5). Cả hai kháng thể VK-R và VK-S có thể so sánh được với kháng thể dạng khảm C2, chứng tỏ rằng các cải biến riêng rẽ với CDRL2 chọn lọc không tác động rõ rệt đến hoạt tính của kháng thể trong thử nghiệm.

Ví dụ 10: Xác định ái lực

Để đánh giá tính đặc hiệu và ái lực gắn kết của kháng thể được làm tương thích với người (H4K1; H4K4) và dạng khảm (AF) (ACI-01-Ab-7-C2) chimeric và humanized, phân tích BIACORE. RTM. được tiến hành nhờ sử dụng các monome và các sợi beta 1-42 làm kháng nguyên bất động trên chip CM5. Kỹ thuật BIACORE.RTM. sử dụng các thay đổi trong danh mục có tính khúc xạ ở lớp bề mặt khi gắn kết của kháng thể với kháng nguyên bất động trên lớp. Gắn kết được phát hiện bằng sự cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) của tính khúc xạ ánh sáng laze từ bề mặt. Phân tích động lực học tín hiệu đối với tốc độ và tốc độ

dùng cho phép phân biệt giữa tương tác đặc hiệu và không đặc hiệu. Nồng độ của kháng thể được sử dụng trong giới hạn 0,05 μ M đến 1,0 μ M.

Bảng 1: ái lực và tính đặc hiệu gắn kết của các kháng thể được làm tương thích với người (H4K1; H4K4) và dạng khảm (AF) chuột (ACI-01-Ab-7-C2) đối với các monome và các sợi beta 1-42

	Các monome			Các sợi		
	$k_a(1/Ms)$	$K_d(1/s)$	KD (M)	$k_a(1/Ms)$	$K_d(1/s)$	KD (M)
ACI-01-Ab-7-C2 chuột	1,8E+04	2,7E-03	1,5E-07	2,4E+04	9,9E-04	4,1E-08
AF dạngkhảm	4,7E+04	9,5E-04	2E-08	5,1E+04	3,3E-04	6,5E-09
H4K1 được làm tương thích với người	5,0E+04	9,5E-04	1,9E-08	4,9E+04	2,3E-04	4,7E-09
H4K4 được làm tương thích với người	2,5E+04	4,4E-04	1,8E-08	1,3E+05	3,0E-04	2,3E-09

Ví dụ 11 Thử nghiệm gắn kết hoá học mô miễn dịch

11.1 Các lát cắt não người

Não của các bệnh nhân AD và tiền AD không bị sa sút trí tuệ và khoẻ mạnh được lấy từ Universitätsklinik ở Bonn sau khi được chấp thuận theo đúng nguyên tắc. Não được cố định trong formaldehyt và vùng hải mã được loại nước, gắn vào parafin và các phần 5 μ m được cắt bằng thiết bị vi phẫu. Các phần parafin được giữ ở nhiệt độ trong phòng cho tới khi sử dụng. Đối với nguyên liệu mới, các lát cắt ở nhiệt độ thấp 5 μ m được cắt bằng máy điều lạnh và các lát cắt được giữ ở -80°C cho tới khi sử dụng.

11.2 Hoá học mô miễn dịch

Các phần parafin được tách parafin và hydrat hoá lại bằng cách rửa các lát cắt trong xylen tiếp theo là etanol 100%, etanol 90% và etanol 70%. Nền được bằng cách ủ 30 phút trong H₂O₂ 10%, metanol 10% trong nước. Việc thu hồi kháng nguyên đạt được bằng cách ủ các lát cắt trong axit formic 100% trong 3

phút. Sau 3 lần rửa trong dung dịch muối đệm Tris (TBS, độ pH là 7,5), việc đánh dấu không đặc hiệu được phong bế bằng cách ủ trong 2 giờ các lát cắt trong 10% BSA, 0,25% Triton X-100 trong TBS. Sau khi rửa (3 lần rửa trong TBS), việc phong bế kháng thể nội sinh được tiến hành bằng cách bổ sung IgG kháng người không đánh dấu (Biomeda) và ủ các lát cắt trong các ngăn ẩm qua đêm ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 lần rửa khác, kháng thể kháng tinh bột người sơ cấp được thêm vào các lát cắt và ủ thêm 24 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, IgG kháng người thứ cấp đánh dấu bằng phosphatasa kiềm (Sigma) được thêm vào các lát cắt và ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau khi rửa, các lát cắt được phát triển với Liquid permanent Red (Dakocytomation) rửa bằng nước và làm khô bằng không khí trước khi cấy vào môi trường với môi trường cấy vĩnh cửu (corbitbalsam).

Việc cắt lạnh được cố định trong metanol trong 30 phút ở -80°C và nền được giảm bằng cách bổ sung H_2O_2 vào metanol lạnh đến nồng độ cuối cùng là 10% và ủ trong 30 phút ở nhiệt độ trong phòng. Sau 3 lần rửa trong dung dịch muối đệm Tris (TBS, độ pH là 7,5), việc đánh dấu không đặc hiệu được phong bế bằng cách ủ trong 2 giờ các lát cắt trong 10% BSA, 0,25% Triton X-100 trong TBS như nêu trên và quy trình nhuộm tương tự như nêu trên được tiến hành.

Các lát cắt được kiểm tra bằng kính hiển vi Leica DMLB và chụp ảnh nhờ sử dụng máy ảnh Leica DC500 và phần mềm Leica FireCaml.2.0.

Cả hai mảng đánh dấu kháng thể người A và C của não của các bệnh nhân AD (Fig.6). Cả hai mảng khuếch tán và nhân được đánh dấu. Ngoài ra, các mảng khuếch tán ở các bệnh nhân tiền AD không bị sa sút trí tuệ cũng có thể được phát hiện bởi các kháng thể A và C. Tinh bột ở bệnh mạch máu tinh bột não (CAA) được đánh dấu bằng cả hai kháng thể và một số tế bào thần kinh nhuộm màu có thể tương ứng với tinh bột nội bào cũng được phát hiện. Không có sự đánh dấu được thấy trên não đối chứng của bệnh nhân khỏe. Các mảng có thể được phát hiện trên các phần parafin được xử lý trước bằng axit formic nhưng

không có các mảng được đánh dấu trên các phần parafin mà không xử lý trước bằng axit formic và trên các phần cắt lạnh cố định trong metanol. Kháng thể người B không phát hiện các mảng trên các lát cắt parafin và kháng thể chuột không nhuộm parafin hoặc các lát cắt não lạnh.

Các chữ viết tắt:

A = kháng thể dạng khảm gắn kết AF (IgG4) (mC2Ch VHAF)

B = kháng thể dạng khảm không gắn kết B (IgG4) (mC2VHB)

C = kháng thể được làm tương thích với người gắn kết H4K1 (IgG4) (HuVH4/HuVK1)

Chuột = kháng thể chuột ACI-01-Ab-C2 (IgG2b)

Ví dụ 12: Chức năng của mC2 đối với các sợi tinh bột

12.1. Quá trình cải biến cấu hình của các sợi $A\beta_{1-42}$ và quá trình bắt đầu làm tan rã sau khi gắn kết kháng thể mC2.

Để đánh giá cơ chế nhờ đó kháng thể có thể làm tan rã các sợi tinh bột β đã tạo ra trước đó ($A\beta_{1-42}$), so sánh đầu đối đầu của thử nghiệm huỳnh quang Thioflavin-T (Th-T) được tiến hành xác định mức tan rã và cộng hưởng từ hạt nhân trạng thái rắn (NMR) của cấu hình thứ cấp phân tích peptit $A\beta_{1-42}$ đánh dấu bằng $U-^{13}C$ Tyrosin10 và Valin12 (Fig.7A). Kháng thể làm tan 35,4% các sợi $A\beta_{1-42}$ tạo ra trước đó và đồng thời kích thích sự thay đổi cấu hình thứ cấp từ tấm β thành cuộn ngẫu nhiên. Việc làm giảm chủng loại của cấu hình tấm β về cuộn ngẫu nhiên tới 35% và vì vậy gắn với cấu hình được xác định nhờ sử dụng thử nghiệm phát huỳnh quang Th-T (Fig.7B). Thông số này chứng tỏ rằng việc gắn kết của kháng thể mC2 khởi đầu sự đồng hoán của cấu trúc thứ cấp mà có khả năng tạo ra sự mất ổn định của việc sắp xếp giữa các phân tử tương đương của các tấm β dẫn đến làm gãy các sợi kéo dài thành các phần ngắn hơn.

12.2 Ái lực gắn kết phụ thuộc cấu hình của kháng thể mC2

Do đã biết rõ trong tài liệu khoa học chuyên ngành rằng phần năng lượng gắn kết kháng thể-kháng nguyên có thể được sử dụng để tạo ra cải biến phụ thuộc năng lượng cấu hình của kháng nguyên (Blond and Goldberg, 1987), thử nghiệm so sánh ái lực gắn kết của kháng thể C2 với toàn bộ protein $A\beta_{1-42}$ và với axit amin thứ chín, nhỏ hơn, kéo dài, peptit bao gồm epitop của kháng thể được tiến hành (Fig.8). Đối với so sánh này, các ái lực của kháng thể được làm tương thích với người C2 được phân tích bằng ELISA nhờ sử dụng các peptit biotinyl hoá bao trùm trình tự axit amin của epitop của C2 (được tạo ra bởi Mimotopes và được mua của ANAWA Trading SA) và peptit biotinyl hoá hoàn toàn $A\beta_{1-42}$ (Bachem). Phân tích được thực hiện theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất (Mimotopes). Như thể hiện trong Fig.8 và bảng 2, kháng thể gắn kết với peptit bao gồm epitop đặc hiệu của nó (các axit amin 13-21 của trình tự $A\beta_{1-42}$) có ái lực cao hơn 36,0% so với toàn bộ protein $A\beta_{1-42}$. Vì vậy có gợi ý rằng sự khác biệt về năng lượng ái lực gắn kết được sử dụng cho sự đồng hoán năng lượng-sử dụng của cấu hình thứ cấp của protein dạng tinh bột thể hiện kháng nguyên ở vị trí thích hợp hơn đối với tương tác kháng thể. Điều này giải thích tại sao ái lực của kháng thể đối với loại tự nhiên (toàn bộ protein dạng tinh bột) thấp hơn đối với cấu trúc siêu phân tử phân lập.

Bảng 2

	O.D	
	Tinh bột beta 13-21	Tinh bột beta 1-42
hC2	1,225	0,9005
Đối chứng IgG	0,171	0,196

Ví dụ 13: Các tác động của hC2 kháng tinh bột đối với sự kết tủa của peptit tinh bột 1-42

Để đánh giá khả năng của kháng thể đơn dòng tinh bột beta kháng nguyên được làm tương thích với người hC2 để làm trung hoà các tác dụng làm tan rã và làm tan rã đối với tinh bột beta ($A\beta$), thử nghiệm phổ huỳnh quang thioflavin T được thực hiện.

13.1 Thử nghiệm ức chế kết tụ

Bột đông khô $A\beta_{1-42}$ được hoàn nguyên trong hexafloisopropanol (HFIP) tới 1mM. Dung dịch peptit được siêu âm trong 15 phút ở nhiệt độ trong phòng, khuấy qua đêm, và các phần tạo thành được cho vào các ống không thấm silic siêu ly tâm. Sau đó HFIP được làm bay hơi dưới dòng khí argon. Màng peptit được làm khô trong chân không trong 10 phút và giữ ở -80°C cho tới khi sử dụng.

Để thử nghiệm về sự ức chế kết tụ $A\beta_{1-42}$ nhờ kháng thể, kháng thể hC2 được pha loãng trước trong PBS và dung dịch thử nghiệm chứa các thành phần dưới đây được tạo ra trong ống nghiệm ủ không thấm silic 3,3 hoặc $0,33\mu\text{M}$ kháng thể pha loãng trước, $10\mu\text{M}$ thioflavin T, $33\mu\text{M}$ $A\beta_{1-42}$, và 8,2% DMSO. Vì vậy, tỷ số mol cuối cùng của kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:10 và 1:100. Các dung dịch đối chứng thích hợp cũng được tạo ra. Các dung dịch sau đó được ủ trong 24 giờ ở 37°C , và phổ huỳnh quang (các đơn vị huỳnh quang liên quan; RFU) đọc ở sáu bản sao trong các đĩa 384 giếng đen (Perkin-Elmer) bằng phổ huỳnh quang kế Perkin-Elmer FluoroCount. Sau đó phổ huỳnh quang được xác định và % làm tan rã được tính toán như mô tả dưới đây.

13.2 Thử nghiệm làm tan rã

Để thử nghiệm về sự làm tan rã $A\beta_{1-42}$ tích tụ trước đó nhờ kháng thể, $A\beta_{1-42}$ phân tử lượng thấp, được điều chế như được mô tả ở trên, được tạo thành $110\mu\text{M}$ dung dịch trong 27% DMSO và 1x PBS. Sau đó dung dịch này được kết tụ ở 37°C trong 24 giờ, sau đó thành phần sau được thêm vào $3,3$ hoặc $0,33\mu\text{M}$ kháng thể pha loãng trước, và $10\mu\text{M}$ thioflavin T. Nó tạo ra tỷ số mol kháng thể

với $A\beta_{1-42}$ là 1:10 và 1:100. Sau đó dung dịch này được ủ thêm 24 giờ ở 37°C. Sau đó phổ huỳnh quang được xác định và % làm tan rã được tính toán như mô tả dưới đây.

13.3 Tính toán

Mức độ ức chế kết tụ hoặc làm tan rã được biểu hiện là % ức chế hoặc làm tan rã trung bình tương ứng, sai số chuẩn $\square$ của số trung bình (SEM) theo phương trình dưới đây:

$$\% \text{ức chế} = \frac{(\text{RFU của đối chứng âm} - \text{RFU của đối chứng dương}) - (\text{RFU của mẫu có } A\beta_{1-42} - \text{RFU của mẫu không có } A\beta_{1-42}) \times 100\%}{(\text{RFU của đối chứng âm tính} - \text{RFU của đối chứng dương tính})}$$

13.4 Kết quả

13.4.1 Mức độ ức chế sự kết tụ $A\beta_{1-42}$

Mức độ ức chế sự kết tụ $A\beta_{1-42}$ nhờ sử dụng kháng thể hC2 được thể hiện trong bảng 3 và Fig.11. Với tỷ số mol kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:100 mức ức chế trung bình là 30% (2 thử nghiệm độc lập), trong khi với tỷ số mol 1:10 thì mức ức chế là 80% (2 thử nghiệm độc lập; xem bảng 3).

Bảng 3. Mức ức chế kết tụ $A\beta_{1-42}$ nhờ hC2 với các tỷ số mol của kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:100 và 1:10

Kháng thể	Tỷ số mol (kháng thể với $A\beta_{1-42}$)	
	1:100	1:10
hC2	$30,0 \pm 4,1\%$	$80,4 \pm 6,9\%$

13.4.2 Mức làm tan rã $A\beta_{1-42}$ kết tụ trước đó

Mức làm tan rã $A\beta_{1-42}$ kết tụ trước đó nhờ sử dụng kháng thể hC2 được thể hiện trong bảng 4 và Fig.12. Với tỷ số mol kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:100 mức

làm tan rã trung bình là 24%, trong khi với tỷ số mol 1:10 mức làm tan rã là 32% (3 thử nghiệm độc lập; xem bảng 4).

Bảng 4. Mức làm tan rã $A\beta_{1-42}$ kết tụ trước đó nhờ hC2 với các tỷ số mol kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:100 và 1:10

Kháng thể	Tỷ số mol (kháng thể với $A\beta_{1-42}$)	
	1:100	1:10
hC2	$30,0 \pm 4,1\%$	$80,4 \pm 6,9\%$

Nhờ sử dụng thử nghiệm thioflavin, các đặc tính chức năng kép của kháng thể kháng β được làm tương thích với người hC2 có thể được chứng minh, đó là ức chế sự kết tụ của $A\beta_{1-42}$ trong cấu hình tiền fibrin gây bệnh và ngoài ra để làm tan rã các tiền fibrin $A\beta_{1-42}$ hình thành trước đó. hC2 ức chế sự kết tụ $A\beta_{1-42}$ tới 80% với tỷ số mol kháng thể với $A\beta_{1-42}$ là 1:10. Khả năng của hC2 để làm tan rã các tiền fibrin hình thành trước đó $A\beta_{1-42}$ với tỷ số mol 1:10 được thể hiện là 32%.

Ví dụ 14: Gắn kết đặc hiệu cấu hình của mC2 với các loại protein dạng tinh bột khác nhau.

Để đánh giá tính đặc hiệu của mC2 tới các tầng khác nhau của protein dạng tinh bột polyme hoá, tinh bột đơn phân và polyme tan, và tinh bột sợi mảnh rất nhỏ, ELISA được bao bằng các tầng khác nhau của dạng tinh bột polyme β được tiến hành (Fig.9). Các chất đơn phân được điều chế theo phương pháp cải biến được công bố bởi (Klein, 2002), tinh bột polyme tan beta theo (Barghorn et al, 2005, trong khi các sợi được tiến hành bằng cách ủ tinh bột (Bachem, Switzerland) với nồng độ cuối cùng là $1\mu\text{g}/\mu\text{l}$ trong Tris/HCl, độ pH là 7,4, ở 37°C trong 5 ngày tiếp theo là bước làm ly tâm (10.000 vòng phút trong 5 phút). Sau đó polyme tinh bột được phủ lên các đĩa ELISA với nồng độ cuối cùng là $55\mu\text{g}/\text{ml}$ và ái lực gắn kết ELISA nhờ sử dụng kháng thể đơn dòng IgG kháng

chuột (Jackson) đánh dấu bằng phosphat kiềm được tiến hành. Như thể hiện trong bảng 5, kháng thể mC2 gắn kết với tinh bột polyme tan beta với ái lực cao hơn với các sợi và thấp nhất với các chất đơn phân. Thông số đó chứng tỏ rằng gắn kết của kháng thể bị tác động bởi epitop tinh bột và bởi cấu hình của các chất kết tụ dạng tinh bột khác nhau.

Bảng 5 gắn kết đặc hiệu cấu hình của mC2 với các monome, oligome và các sợi tinh bột

mC2	O.D		
Ab Conc (ug/ml)	Oligome	Các sợi	Monome
0,625	2,806	1,620	1,155
0,312	1,724	0,989	0,649
0,156	1,036	0,631	0,397
0,078	0,652	0,499	0,333

Ví dụ 15: vẽ bản đồ epitop của kháng thể đơn dòng của miễn dịch AC hC2

Việc vẽ bản đồ epitop của kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người hC2 được tiến hành bằng ELISA nhờ sử dụng ba thư viện peptit khác nhau. Một thư viện bao gồm tất cả 33 peptit biotinyl hoá che phủ cả trình tự axit amin hoàn chỉnh (aa) của $A\beta_{1-42}$ (được tạo ra bởi Mimotopes và mua của ANAWA Trading SA), thư viện thứ hai có các peptit biotinyl hoá nhờ sử dụng peptit 12 (aa12-20 của $A\beta$) từ thư viện peptit thứ nhất và thay thế aa trong trình tự bằng alanin (xem bảng 8 dưới đây), và thư viện thứ ba có các peptit biotinyl hoá 13, 14, hoặc 15 (aa 13-21, 14-22 hoặc 15-23 của $A\beta$) và thay thế trong mỗi trường hợp các axit amin cuối cùng đến alanin hoặc đến glyxin bằng aa 21 đã là alanin (xem bảng 9 dưới đây). Peptit hoàn chỉnh biotinyl hoá $A\beta_{1-42}$ được sử dụng làm đối chứng dương tính (Bachem). Vẽ bản đồ epitop được tiến hành theo các chỉ

dẫn của nhà sản xuất (Mimotopes). Một cách vắn tắt, các đĩa phủ streptavidin (NUNC) được phong bế bằng 0,1% BSA trong PBS qua đêm ở 4°C. Sau khi rửa bằng PBS-0,05% Tween 20, các đĩa được phủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng các peptit khác nhau từ thư viện, pha loãng trong 0,1% BSA, 0,1% natri azit trong PBS tới nồng độ cuối cùng là 10 μ M. Sau khi rửa, các đĩa được ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng bằng kháng thể hC2 hoặc kháng thể IgG4 dạng khảm không gắn kết A β được pha loãng 200ng/ml trong 2% BSA, 0,1% natri azit trong PBS. Các đĩa được rửa lại và ủ bằng IgG dê kháng người kết hợp với phosphatasa kiềm trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau lần rửa cuối cùng, các đĩa được ủ với chất nền phosphatasa (pNPP) và đọc ở 405nm nhờ sử dụng đầu đọc đĩa ELISA.

Điều đó chứng tỏ rằng kháng thể đơn dòng được làm tương thích với người hC2 gắn kết đặc hiệu với các peptit 12, 13, 14, 15 và 16 của thư viện peptit thứ nhất. Các peptit đó bao gồm aa 12- 20, 13-21, 14-22, 15-23 và 16-24 tương ứng của A β ₁₋₄₂, gợi ý rằng epitop nằm trong vùng 12-24 của A β . Thư viện thứ hai với các thay thế alanin được sử dụng để xác định aa giới hạn đối với gắn kết với A β ₁₋₄₂ (VHHQKLVFF). Gắn kết của kháng thể hC2 mất hoàn toàn khi các axit amin 16, 17, 19 hoặc 20 được thay thế bằng alanin, chứng tỏ rằng aa là giới hạn tuyệt đối cho gắn kết của kháng thể với A β . Gắn kết của kháng thể hC2 mất một phần khi aa 15 và 18 được thay thế.

Gắn kết hầu như mất hoàn toàn khi aa 14 được thay thế bằng alanin, chứng tỏ rằng aa 14 cũng rất quan trọng đối với gắn kết.

Cuối cùng, thư viện thứ ba được sử dụng để xác định có hay không aa 21, 22 hoặc 23 là giới hạn đối với gắn kết với epitop. Gắn kết của kháng thể với aa 15-23 được giảm khi aa 23 được thay thế bằng alanin, chứng tỏ rằng aa 23 cũng quan trọng đối với gắn kết. Gắn kết mất một phần khi aa 21 được thay thế bằng glyxin và mất một chút khi aa 22 được thay thế bằng alanin.

Ví dụ 16: Bảo vệ thần kinh bằng kháng thể hC2

Khả năng của kháng thể hC2 để bảo vệ các neuron khỏi sự thoái biến do oligome Abeta gây ra được đánh giá trong thử nghiệm *in vitro*. Các neuron vỏ não chuột phôi ngày 16.5-17.5 được phân lập, tách ra, và nuôi cấy *in vitro* trong môi trường N3-F12. Các tế bào được sinh trưởng trong toàn bộ chín ngày, và được cung cấp vào ngày 3 và ngày mà oligome Abeta, hoặc oligome Abeta cùng với kháng thể kháng Abeta hC2 được thêm vào. Vào ngày thứ năm ("4 ngày Abeta") hoặc ngày sáu ("3 ngày Abeta"), một vài giếng chứa các tế bào được xử lý hoặc chỉ bằng 2 μ M oligome Abeta, hoặc hỗn hợp của 2 μ M oligome Abeta và 50 μ g/mL kháng thể kháng Abeta hC2.

Oligome Abeta được điều chế bằng cách hoà tan Abeta 1-42 (rPeptit) trong HFIP, từ đó các peptit Abeta được chia thành các phần 10 μ l với 1mg/ml và sau đó làm bay hơi trong chụp khối trong 30 phút và các màng peptit được giữ ở -80°C cho tới khi sử dụng. Khi sử dụng, màng peptit được hoà tan trong 10 μ l DMSO, sau đó là 78,6 μ l HAMS F12, và dung dịch peptit Abeta được ủ ở 4°C trong 24-48 giờ (25 μ M nồng độ Abeta cuối cùng).

Đối với các tế bào đối chứng, riêng DMSO-F12 được thêm vào với thể tích tương tự như Abeta-DMSO vào ngày 5, và các tế bào được nuôi cấy thêm 4 ngày nữa mà không cần bất kỳ xử lý bổ sung nào. Vào ngày 9, các neuron từ tất cả các điều kiện nuôi cấy được cố định và nhuộm bằng Tuj1 (kháng thể kháng beta-tubulin), tiếp theo là nhuộm với các kháng thể thứ phát được đánh dấu bằng FITC để hình dung các vi tiểu quản, và vì vậy các quy trình tế bào thần kinh là chung. Các kết quả được thể hiện trong Fig.13.

Các tế bào thần kinh vỏ não phôi chuột chưa xử lý thể hiện hình thái học bình thường sau chín ngày nuôi cấy (Fig.13, cột cực tả). Xử lý các tế bào bằng oligome Abeta trong ba ngày kích thích sự thoái biến sợi trục và làm giảm số lượng sợi trục tổng (Fig.13, cột giữa thấp), và tác động này thậm chí còn thấy rõ

rệt vào bốn ngày xử lý (Fig.13, cột giữa cao hơn). Ngược lại, các tế bào được xử lý bằng hỗn hợp của oligome Abeta và kháng thể kháng Abeta hC2 có vẻ tương tự với các tế bào đối chứng (Fig.13, các cột bên phải cao hơn và thấp hơn). Các kết quả này biểu thị rằng kháng thể kháng Abeta hC2 có thể bảo vệ các tế bào thần kinh vỏ não phôi chuột khỏi sự thoái hoá do oligome Abeta gây ra.

Bảng 6: Các vị trí và thay đổi được tạo ở các vùng khung chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2

Vị trí chuỗi nhẹ	45	87	50	53
C2V _K chuột	K	F	K	N
C2HuV _K 1 được làm tương thích với người	Q	Y	K	N
C2HuV _K 2 được làm tương thích với người	Q	F	K	N
C2HuV _K 3 được làm tương thích với người	K	Y	K	N
C2HuV _K 4 được làm tương thích với người	K	F	K	N
dpk15 dòng mầm người	Q	Y	L	N
C2V _K —R chuột			R	
C2V _K -S chuột				S

Bảng 7: Các vị trí và thay đổi được tạo ở các vùng khung chuỗi nặng được làm tương thích với người C2

Vị trí chuỗi nặng	47	94
C2VHAF chuột	L	S
C2HuVHAF1 được làm tương thích với người	W	R
C2HuVHAF2 được làm tương thích với người	W	S
C2HuVHAF3 được làm tương thích với người	L	R
C2HuVHAF4 được làm tương thích với người	L	S

DP—54 dòng mầm người	W	R
----------------------	---	---

Tổng số 8 kháng thể khá nhau được cấu trúc với các chuỗi nhẹ C2HuV_K1, C2HuV_K2, C2HuV_K3, C2HuV_K4 và các chuỗi nặng C2HuVHAF4 và C2HuVHAF2

Bảng 8. Tóm tắt về các peptit sử dụng trong thư viện thứ hai

aa là quan trọng đối với gắn kết được đánh dấu bằng các chữ in nghiêng và đường gạch dưới và aa tuyệt đối quan trọng đối với gắn kết được đánh dấu bằng các chữ in nghiêng và đậm.

p12-20	V	H	H	Q	K	L	V	F	F
A12	A	H	H	Q	K	L	V	F	F
A13	V	A	H	Q	K	L	V	F	F
A14	V	H	A	Q	K	L	V	F	F
A15	V	H	H	A	K	L	V	F	F
A16	V	H	H	Q	A	L	V	F	F
A17	V	H	H	Q	K	A	V	F	F
A18	V	H	H	Q	K	L	A	F	F
A19	V	H	H	Q	K	L	V	A	F
A20	V	H	H	O	K	L	V	F	A
aa no.	12	13	<u>14</u>	<u>15</u>	<u>16</u>	<u>17</u>	<u>18</u>	<u>19</u>	<u>20</u>

Bảng 9. Tóm tắt về các peptit sử dụng trong thư viện thứ ba

aa là quan trọng đối với gắn kết được đánh dấu bằng các chữ in nghiêng và đường gạch dưới và aa tuyệt đối quan trọng đối với gắn kết được đánh dấu bằng các chữ in nghiêng và đậm.

p13-21		H	H	Q	K	L	V	F	F	A		
p13-21	G21	H	H	Q	K	L	V	F	F	G		
p14-22			H	Q	K	L	V	F	F	A	E	
p14-22	A22		H	Q	K	L	V	F	F	A	A	
p15-23				Q	K	L	V	F	F	A	E	D
p15-23	A23			Q	K	L	V	F	F	A	E	A
aa no.		13	14	<i>15</i>	16	<i>17</i>	<i>18</i>	19	20	21	22	<i>23</i>

Danh sách tài liệu tham khảo

Barghorn S, Nimmrich V, Striebinger A, Krantz C, Keller P, Janson B, Bahr M, Schmidt M, Bitner RS, Harlan J, Barlow E, Ebert U, Hillen H (2005) Globular amyloid beta-peptide oligomer - a homogenous and stable neuropathological protein in Alzheimer's disease. *J Neurochem* 95:834-847.

Blond and Goldberg, 1987, PNAS March 1, 1987 Vol. 84 no. 5 1147-1151

Cox JPL, Tomlinson IM và Winter G. *Eur. J. Immunol.* 1994; 24: 827-836. A directory of human germ-line VK segments reveals a strong bias in their usage.

Hieter PA, Max EE, Seidman JG, Maizel JV Jr, Leder P. Cloned human and mouse kappa immunoglobulin constant and J region genes conserve homology in functional segments. *Cell.* 1980 Nov;22(1 Pt 1):197-207.

Kabat EA, Wu TT, Perry HM, Gottesman KS, Foeller C. Sequences of proteins of Immunological Interest, US Department of Health and Human Services, 1991.

Klein WL (2002) Abeta toxicity in Alzheimer's disease: globular soluble polymeric amyloid beta (ADDLs) as new vaccine and drug targets. *Neurochem Int* 41(5):345-352.

Langdon SD, Inaioki M, Kelsoe G. and Tedder TF. *Immunogenetics* 2000; 51: 241-245. Germline sequences of V(H)7183 gene family members in C57BL/6 mice demonstrate natural selection of particular sequences during recent evolution

Mulligan RC and Berg P. *Science* 1980; 209: 1422-1427. Expression of a bacterial gene in mammalian cells.

Riechmann L, Clark M, Waldmann H, Winter G, Nature 1988; 332: 323-327. Reshaping human antibodies for therapy.

Schable KP, Thiebe R, Bensch A, Brensing-Kueppers J, Heim V, Kirschbaum T, Lamm R, Ohnrich M, Pourrajabi S, Roschenthaler F, Schwendinger J, Wichelhaus D, Zocher I and Zachau HG. Eur. J. Immunol. 1999; 29: 2082-2086. Characteristics of the immunoglobulin V kappa genes, pseudogenes, relics and orphans in the mouse genome.

Tomlinson IM, Walter G, Marks JD, Llewelyn MB and Winter G. J. Mol. Biol. 1992; 227: 776- 798. The repertoire of human germline VH sequences reveals about 50 groups of VH segnts with different hypervariable loops.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của chúng mà nhận dạng và gắn kết protein dạng tinh bột β , trong đó kháng thể được làm tương thích với người này hoặc một đoạn của chúng bao gồm:

i) vùng biến đổi chuỗi nặng (HCVR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:15, và

ii) vùng biến đổi chuỗi nhẹ (LCVR) bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:12.

2. Kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của chúng theo điểm 1, bao gồm chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:16 và chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin SEQ ID NO:13.

3. Kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của chúng theo điểm 2, trong đó Lys đầu tận cùng C của vùng ổn định chuỗi nặng được loại bỏ.

4. Kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của chúng theo điểm 1, trong đó kháng thể được làm tương thích với người hoặc một đoạn của chúng là của isotyp IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4.

5. Phân tử axit nucleic bao gồm trình tự nucleotit mã hóa kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của chúng, theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1-4.

6. Phân tử axit nucleic theo điểm 5, trong đó phân tử này bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID NO:22 hoặc trình tự nucleotit SEQ ID NO:21.

7. Phân tử axit nucleic theo điểm 5, trong đó phân tử này bao gồm trình tự nucleotit SEQ ID NO:25 hoặc trình tự nucleotit SEQ ID NO:24.

8. Vật truyền biểu hiện bao gồm trình tự nucleotit theo điểm bất kỳ trong số các điểm 5-7.

9. Tế bào bao gồm vật truyền biểu hiện theo điểm 8.

10. Dược phẩm bao gồm kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, và còn tùy ý bao gồm chất mang dược dụng.

11. Dược phẩm theo điểm 10, trong đó dược phẩm này còn tùy ý bao gồm một hoặc nhiều thành phần sau: chất có hoạt tính sinh học, chất pha loãng hoặc tá dược.

12. Dược phẩm theo điểm 11, trong đó dược phẩm này còn bao gồm chất có hoạt tính sinh học là hợp chất được sử dụng trong điều trị bệnh thoái hóa dạng tinh bột.

13. Dược phẩm theo điểm 11, trong đó dược phẩm này bao gồm ít nhất một trong các hợp chất sau: hợp chất chống sự mất cân bằng oxy hóa; hợp chất chống gây chết tế bào; các chất chelat kim loại, các chất ức chế sửa chữa ADN như pirenzepin và các chất chuyển hóa, axit 3-amino-1-propansulfonic (3 APS), 1,3-propandisulfonat (1,3PDS), các chất hoạt hóa α -secretaza, chất ức chế A β -secretaza; và chất ức chế γ -secretaza, các tau protein, các chất dẫn truyền thần kinh, các chất làm gãy tấm β , các chất dẫn dụ đối với các thành phần tế bào làm sạch/làm cạn tinh bột β ; các chất ức chế tinh bột β làm cùn đầu N, như bao gồm tinh bột β pyroglutamat hóa 3-42, các phân tử kháng viêm, hoặc các chất ức chế cholinesteraza (ChEI) như tacrin, rivastigmin, donepezil, và/hoặc galantamin, các chất chủ vận M1 hoặc dược chất khác như dược chất cải biến tinh bột hoặc tau hoặc các chất bổ sung dinh dưỡng.

14. Phương pháp xác định phạm vi của lượng mảng tinh bột tích tụ trong mẫu mô và/hoặc mẫu dịch thể bao gồm:

- a) thử nghiệm một mẫu mô hoặc mẫu dịch thể về sự có mặt của protein dạng tinh bột với kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4;
 - b) xác định lượng kháng thể hoặc đoạn kháng thể đã gắn kết với protein; và
 - c) tính toán lượng mảng tích tụ trong mẫu mô hoặc mẫu dịch thể.
15. Bộ kit để dò tìm và chẩn đoán các bệnh và tình trạng dạng tinh bột bao gồm, trong một hoặc nhiều vật chứa, kháng thể được làm tương thích với người hoặc đoạn của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, thuốc thử dò tìm và các hướng dẫn sử dụng các kháng thể.
16. Phương pháp *in vitro* để phân tách các sợi dạng tinh bột β có sẵn, bao gồm bước cho kháng thể hoặc đoạn của chúng theo điểm bất kỳ trong số các điểm 2 và 3 tiếp xúc với các sợi dạng tinh bột β có sẵn.

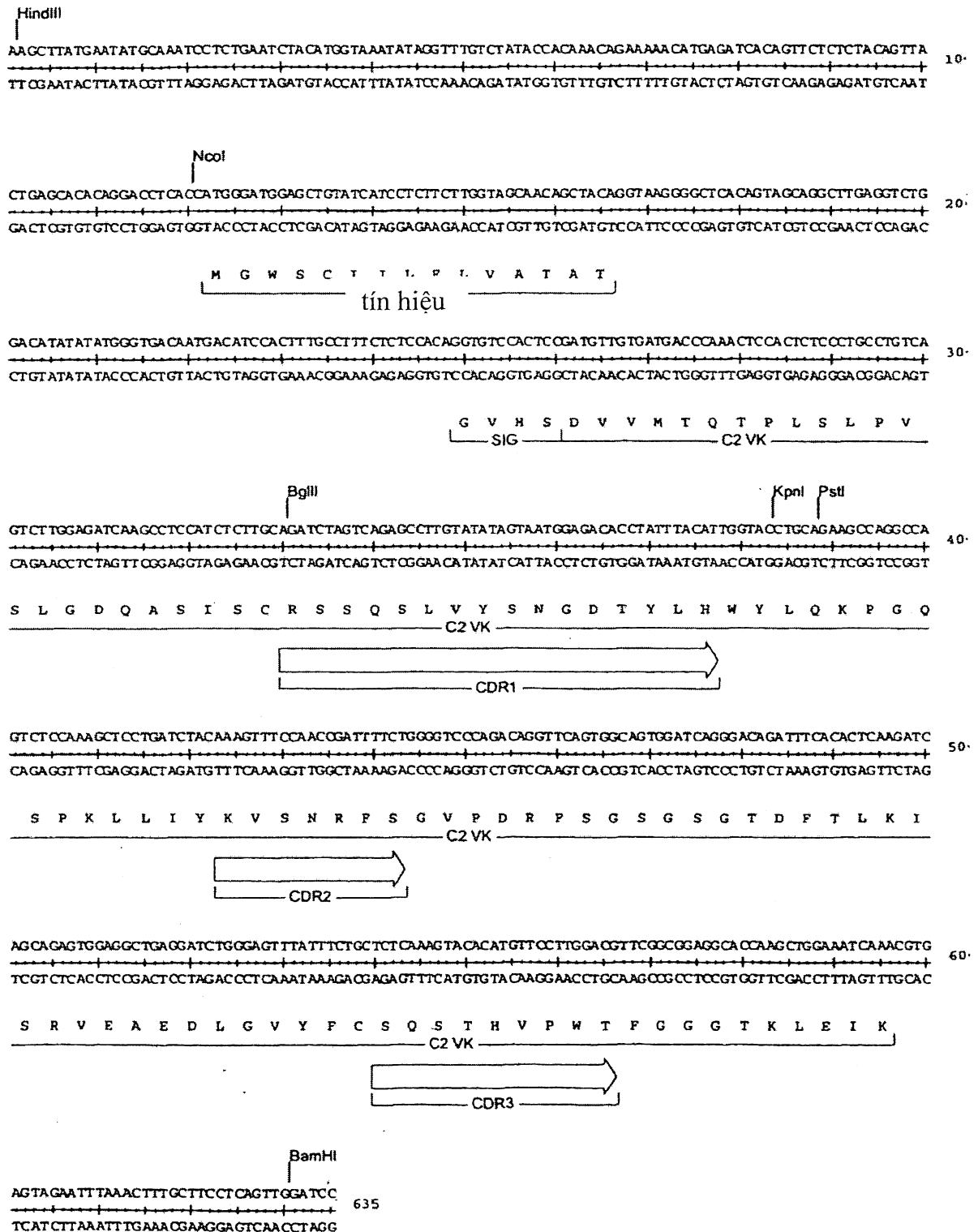


FIG. 1

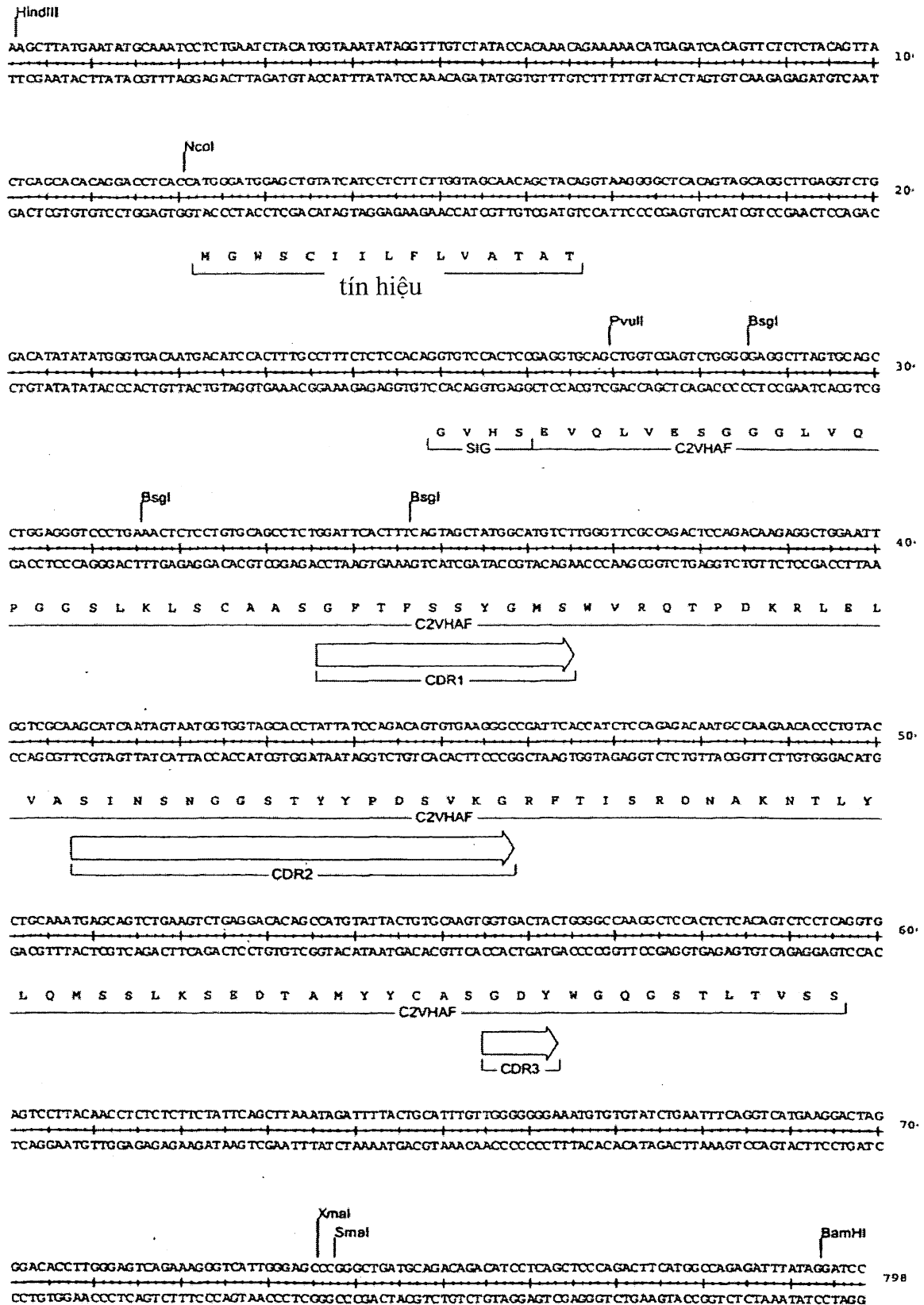


FIG. 2

		10		20		30																								
C2VHAF	E	V	Q	L	V	E	S	G	G	G	L	V	Q	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
AF120466	E	V	K	L	V	E	S	G	G	G	L	V	K	P	G	G	S	L	K	L	S	C	A	A	S	G	F	T	F	S
		40		50		60																								
C2VHAF	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	L	V	A	S	I	N	S	N	G	G	S	T	Y	Y
AF120466	S	Y	G	M	S	W	V	R	Q	T	P	D	K	R	L	E	W	V	A	T	I	S	S	G	G	S	Y	T	Y	Y
		70		80		90																								
C2VHAF	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
AF120466	P	D	S	V	K	G	R	F	T	I	S	R	D	N	A	K	N	T	L	Y	L	Q	M	S	S	L	K	S	E	D
		100		110																										
C2VHAF	T	A	M	Y	Y	C	A	S	G	D	Y	W	G	Q	G	S	T	L	T	V	S	S								
AF120466	T	A	M	Y	Y	C	A	R	R																					

FIG. 3

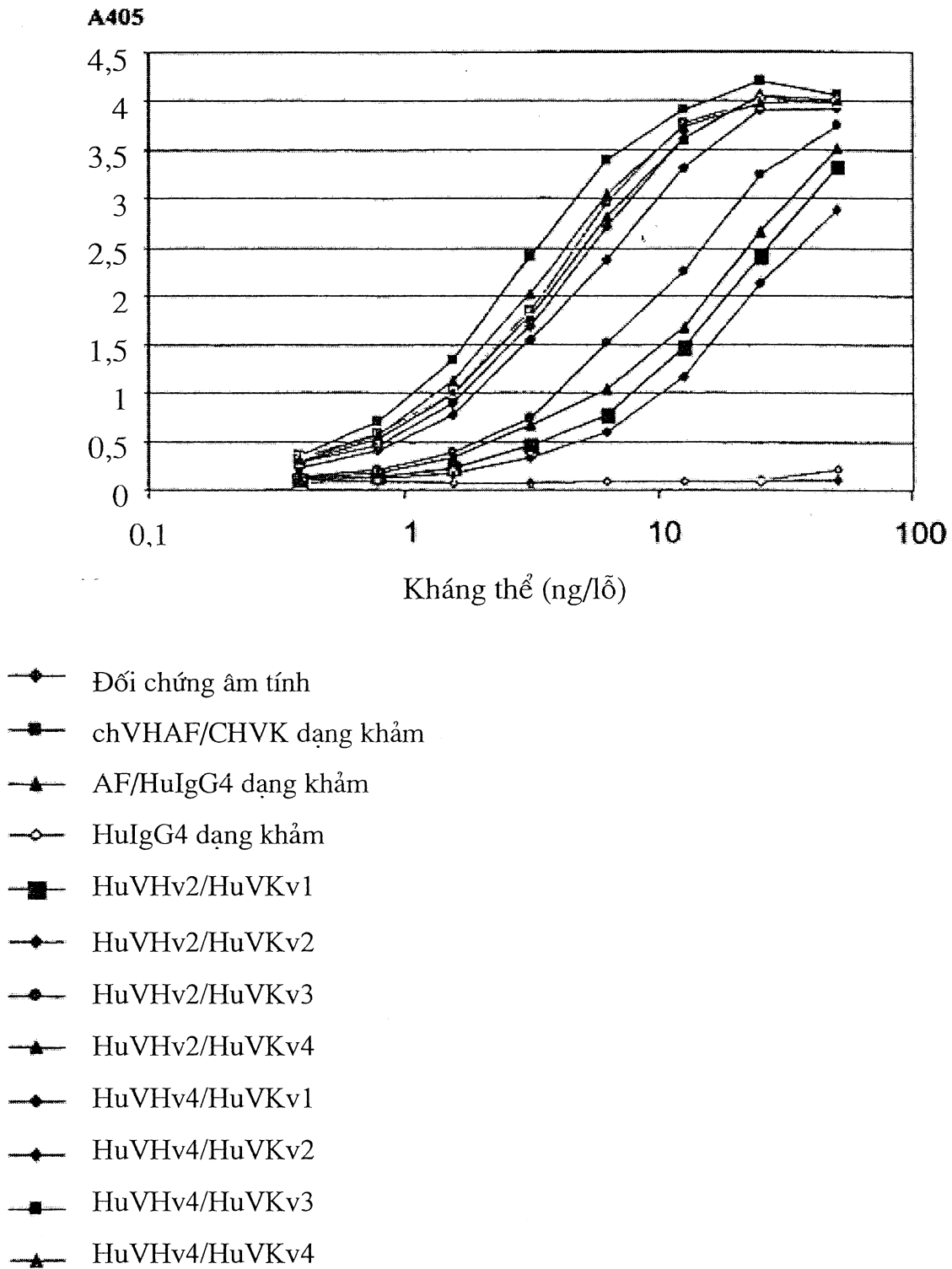


FIG. 4

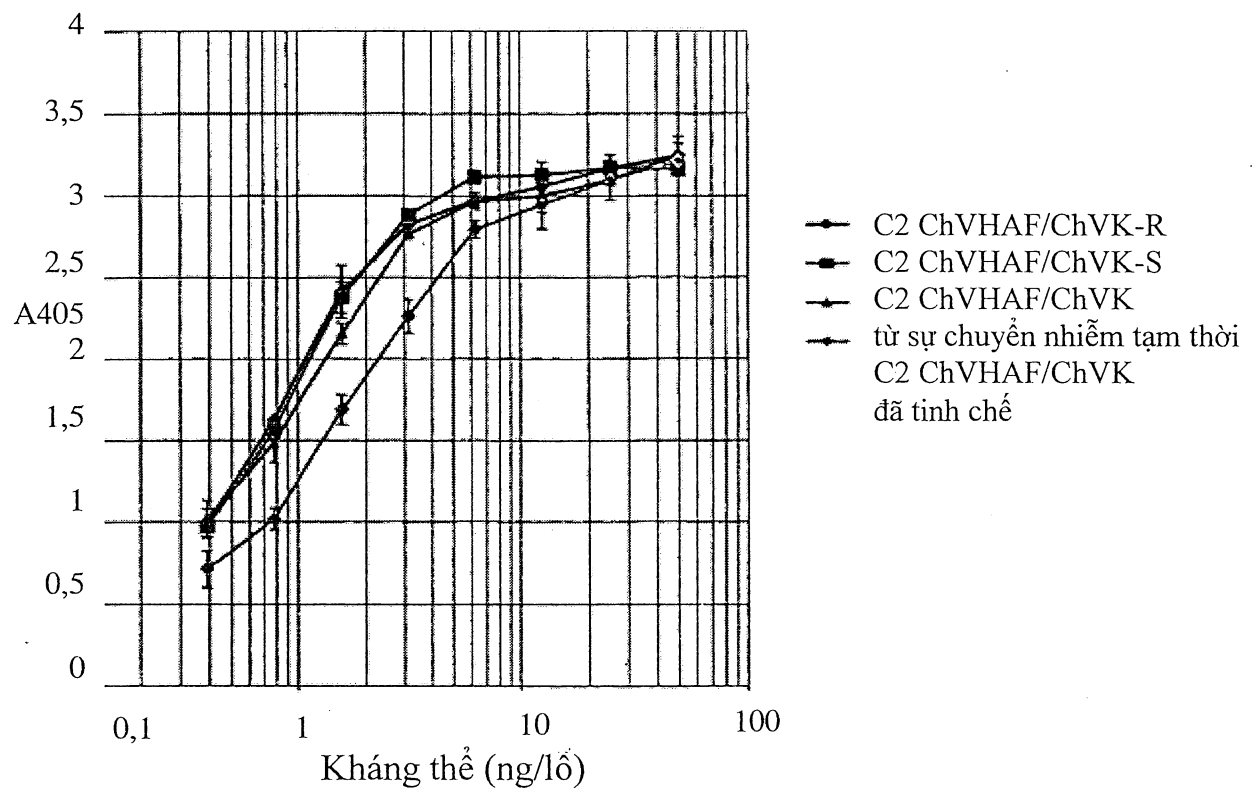


FIG. 5

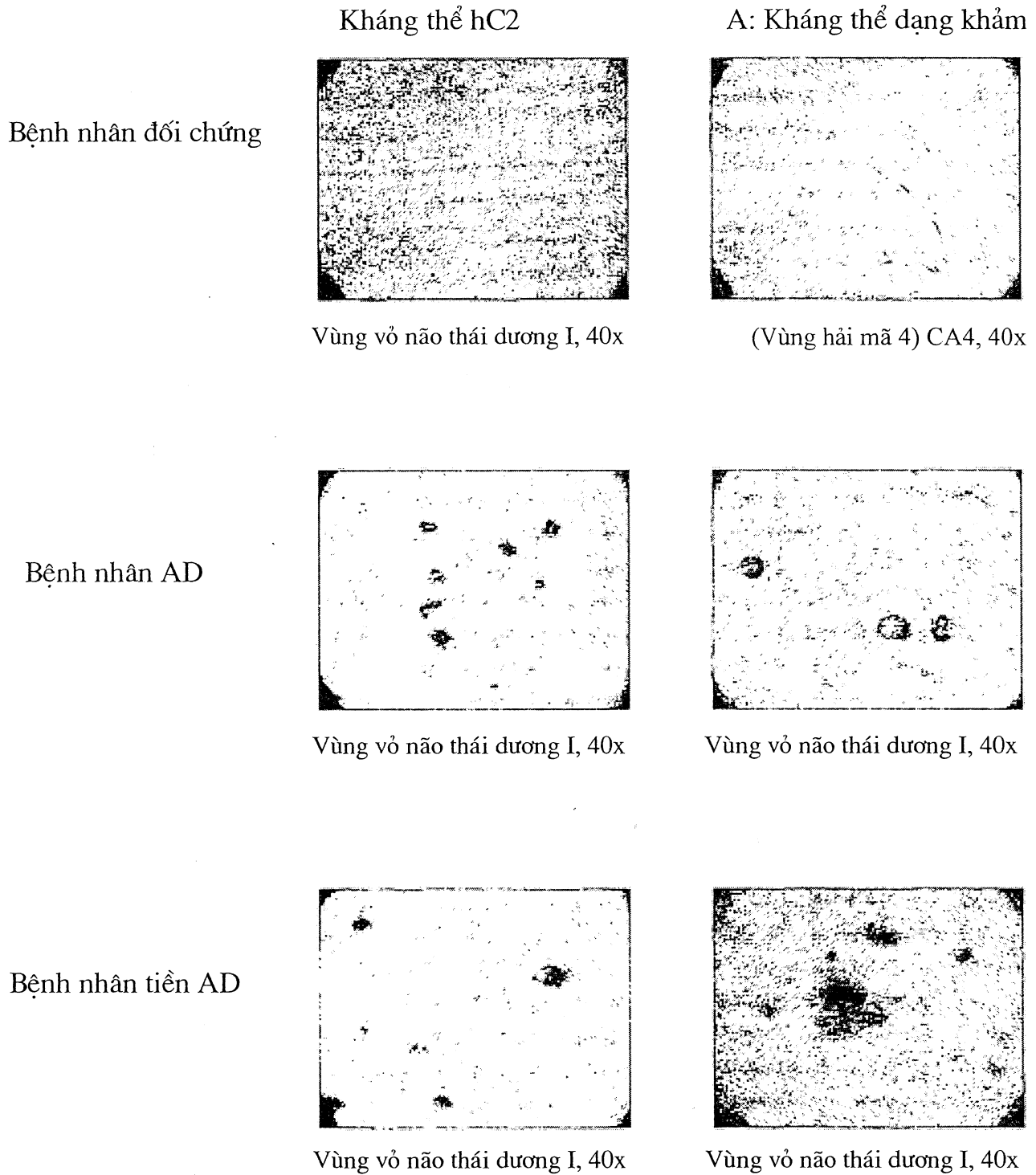
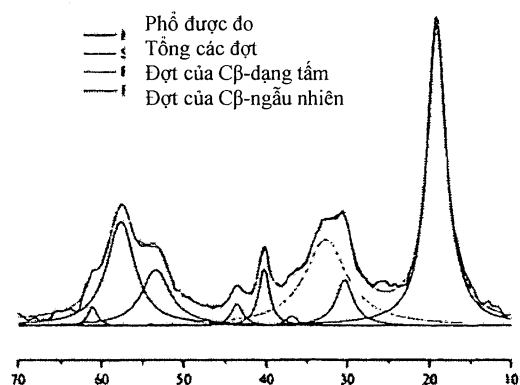
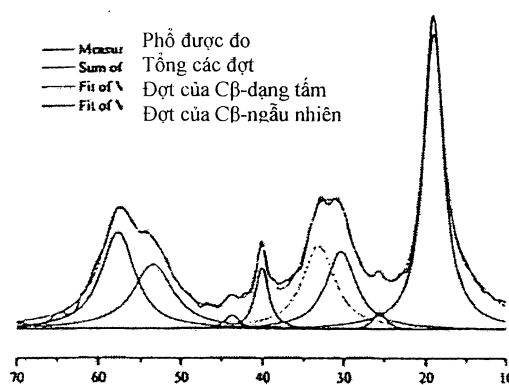


FIG. 6

A)

 ^{13}C Sự thay đổi hóa học (ppm) ^{13}C Sự thay đổi hóa học (ppm)

B)

Cộng hưởng	PBS			C2 chuột		
	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% cường độ tích phân	δ ISO (ppm)	FWHH (Hz)	% cường độ tích phân
Val C/3 –dạng tấm	32,60	479	81,7	33,09	366	53,5
Val C0 –ngẫu nhiên	30,27	200	18,3	30,27	340	46,5

A) Sự so sánh của quang phổ ^{13}C CPMAS và các đợt đối với các sợi β 1-42 dạng tinh bột được gắn nhãn U- ^{13}C Tyr10 và Val12 được ủ với PBS (trái; đóng vai trò như đối chứng) hoặc ACI-7-C2 (phải) trong 24 giờ và sau đó được làm đông khô. Các đợt cho hai thể cấu tạo của Val12 C β được thể hiện theo màu xanh lá cây (dạng tấm) và xanh (ống xoắn ngẫu nhiên). Đỉnh ở 33 ppm tương ứng với thể cấu tạo dạng tấm beta của các sợi trong khi ở 30 ppm là kết quả của thể cấu tạo ống xoắn ngẫu nhiên.

B): Sự so sánh của các thông số thích hợp đối với hai thể cấu tạo của Val 12 C β . Các sự thay đổi hóa học thích hợp đối với hai thể cấu tạo là khá giống nhau nhưng các cường độ tích phân là rất khác nhau, phản ánh sự suy giảm về thể cấu tạo dạng tấm beta gốc bằng xấp xỉ 35% ($1 - (53,5/81,7)$). Điều này rất tương hợp ở mức độ cao với giá trị đã thu được từ đo đặc huỳnh quang.

FIG. 7

O.D. Ái lực gắn kết của C2 được làm tương thích với người trong ELISA

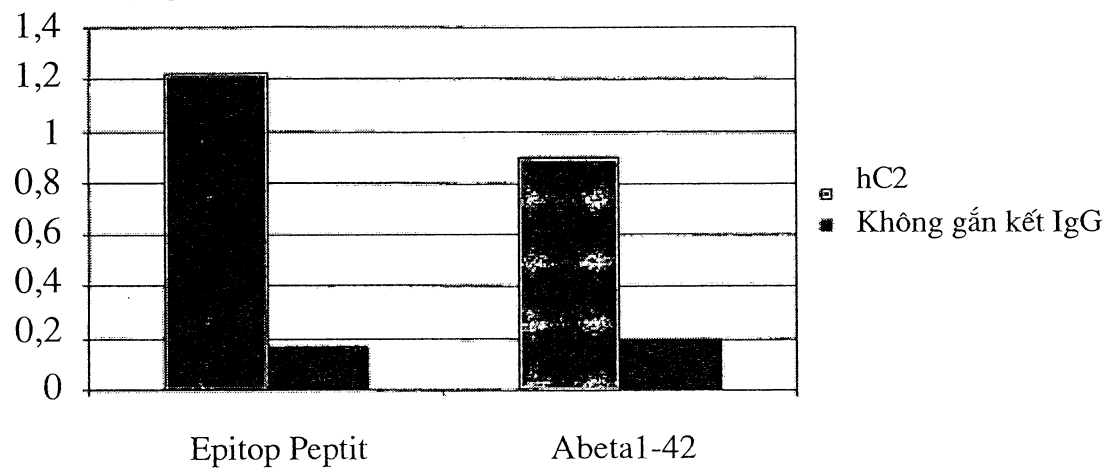


FIG. 8

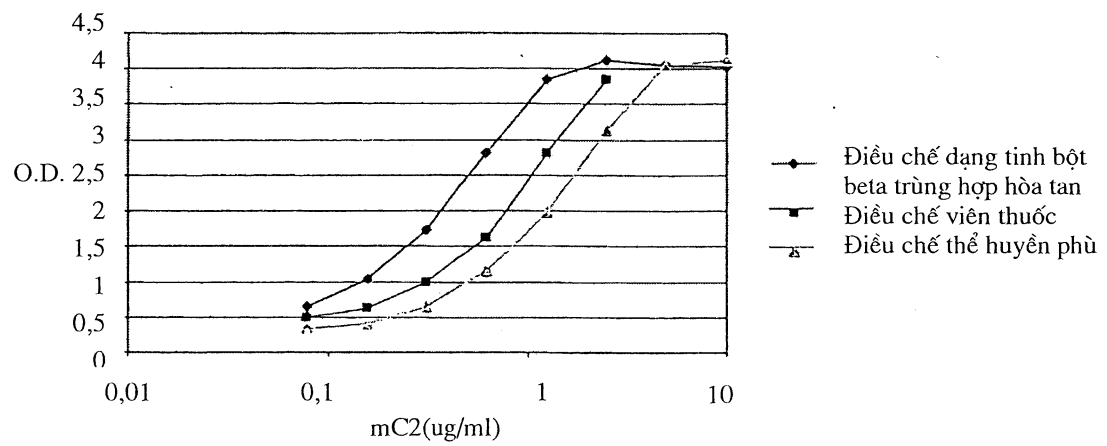


FIG. 9

	10	20	30
C2VK	D V V M T Q T P L S L P V S L G D Q A S I S C R S S Q S L V		
C2HuVK1	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V		
C2HuVK2	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V		
C2HuVK3	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V		
C2HuVK4	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L V		
dpk15	D I V M T Q S P L S L P V T P G E P A S I S C R S S Q S L L		
JK1	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	40	50	60
C2VK	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F		
C2HuVK1	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F		
C2HuVK2	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y K V S N R F		
C2HuVK3	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F		
C2HuVK4	Y S N G D T Y L H W Y L Q K P G Q S P K L L I Y K V S N R F		
dpk15	H S N G Y N Y L D W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y L G S N R A		
JK1	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	70	80	90
C2VK	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D L G V		
C2HuVK1	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
C2HuVK2	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
C2HuVK3	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
C2HuVK4	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
dpk15	S G V P D R F S G S G S G T D F T L K I S R V E A E D V G V		
JK1	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	100	110
C2VK	Y F C S Q S T H V P W T F G G G T K L E I K	
C2HuVK1	Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K	
C2HuVK2	Y F C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K	
C2HuVK3	Y Y C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K	
C2HuVK4	Y F C S Q S T H V P W T F G Q G T K V E I K	
dpk15	Y Y C M Q - - - - - A - L Q T P	
JK1	- - - - - W T F G Q G T K V E I K	

FIG. 10

	10	20	30
C2VHAF	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L K L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF1	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF2	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF3	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
C2HuVHAF4	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
DP-54	E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A A S	G F T F S	
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	40	50	60
C2VHAF	S Y G M S W V R Q T P D K R L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF1	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF2	S Y G M S W V R Q A P G K G L E W V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF3	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
C2HuVHAF4	S Y G M S W V R Q A P G K G L E L V A S I N S N G G S T Y Y		
DP-54	S Y W M S W V R Q A P G K G L E W V A N I K Q D G S E K Y Y		
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	70	80	90
C2VHAF	P D S V K G R F T I S R D N A K N T L Y L Q M S S L K S E D		
C2HuVHAF1	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF2	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF3	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
C2HuVHAF4	P D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
DP-54	V D S V K G R F T I S R D N A K N S L Y L Q M N S L R A E D		
HUJH6	- - - - -	- - - - -	- - - - -

	100	110
C2VHAF	T A M Y Y C A S G D Y W G Q G S T L T V S S	
C2HuVHAF1	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF2	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF3	T A V Y Y C A R G D Y W G Q G T T V T V S S	
C2HuVHAF4	T A V Y Y C A S G D Y W G Q G T T V T V S S	
DP-54	T A V Y Y C A R	
HUJH6	- - - Y Y Y G M - D V W G Q G T T V T V S S	

FIG. 11

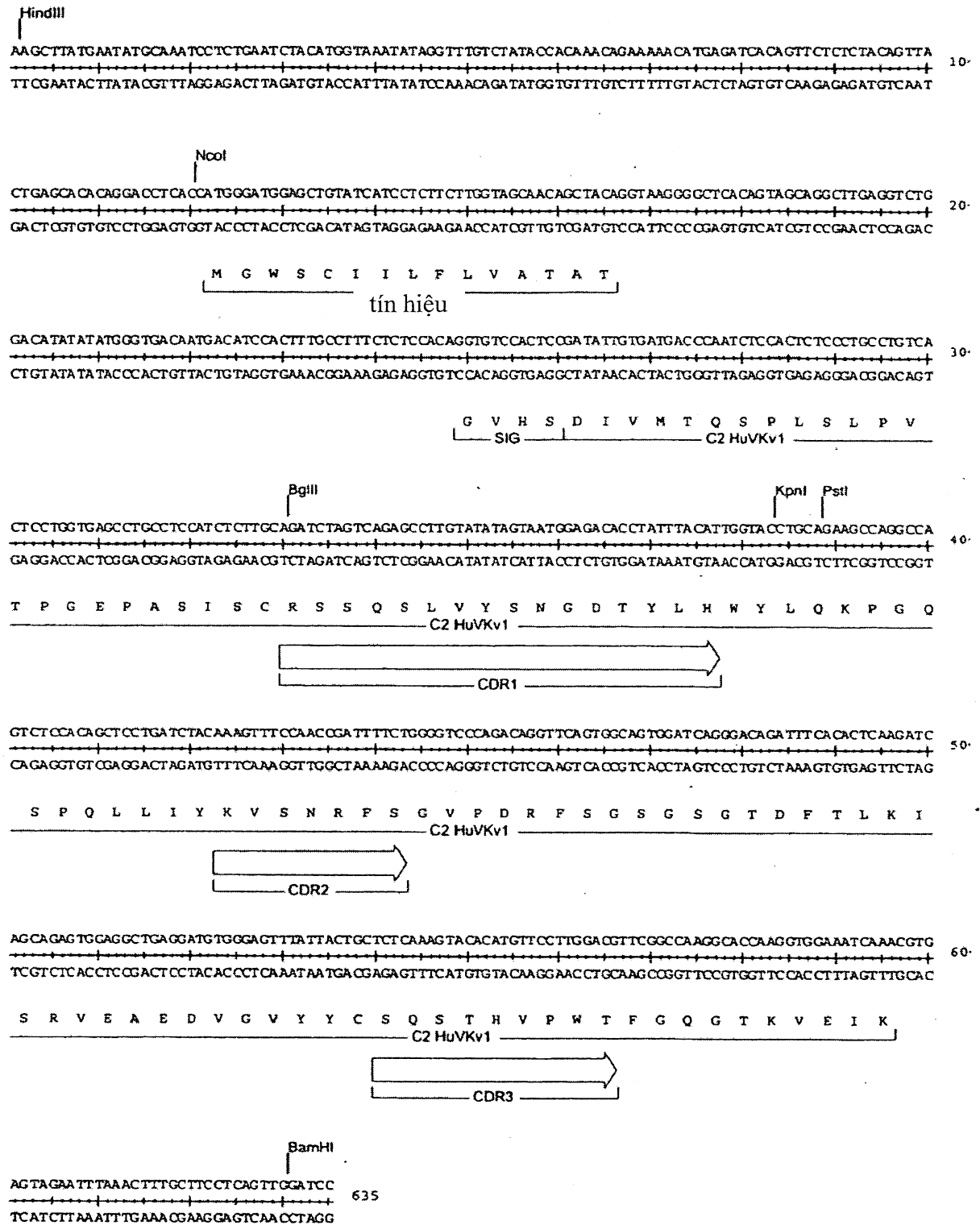


FIG. 12

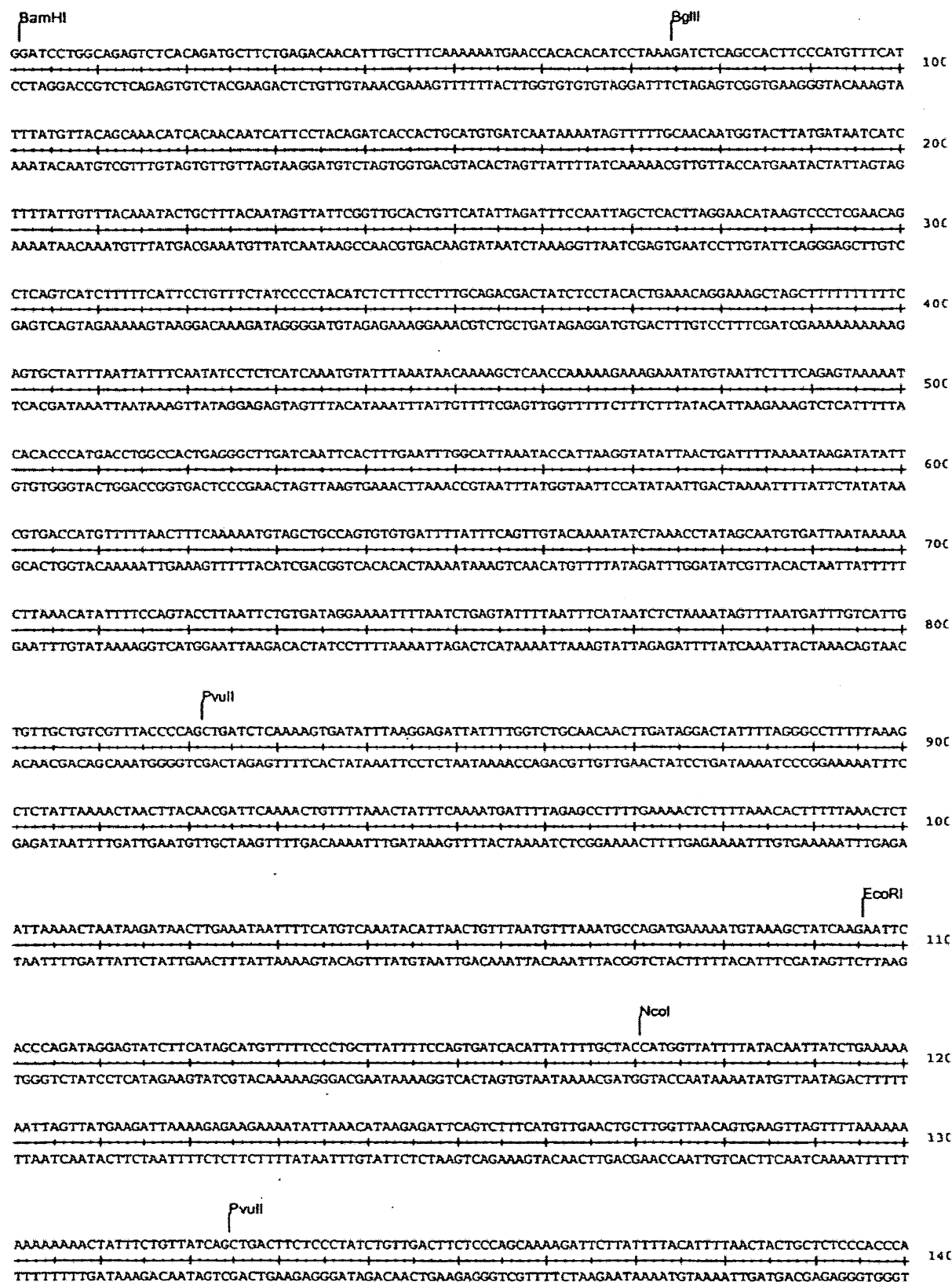


FIG. 13-1

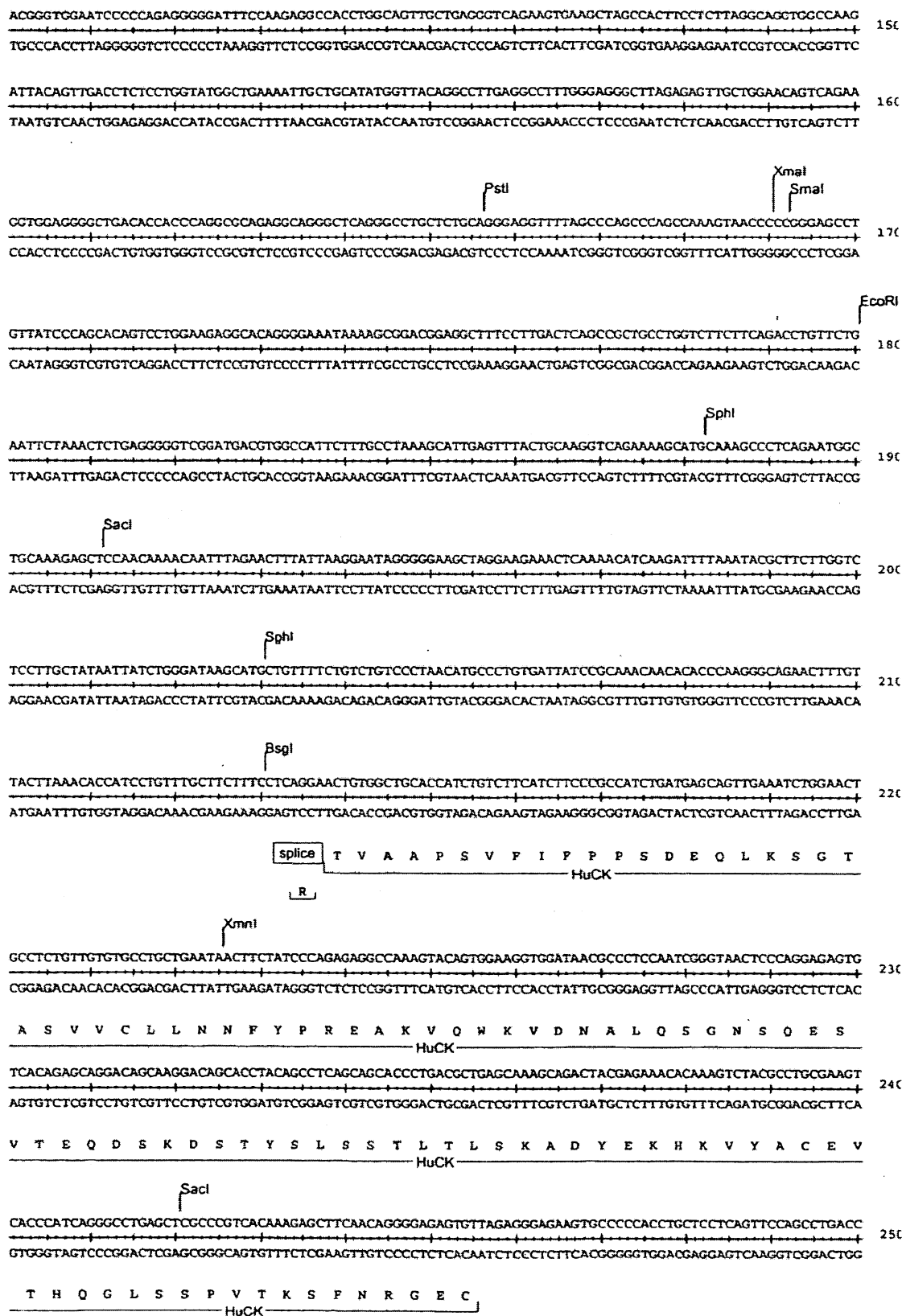


FIG. 13-2

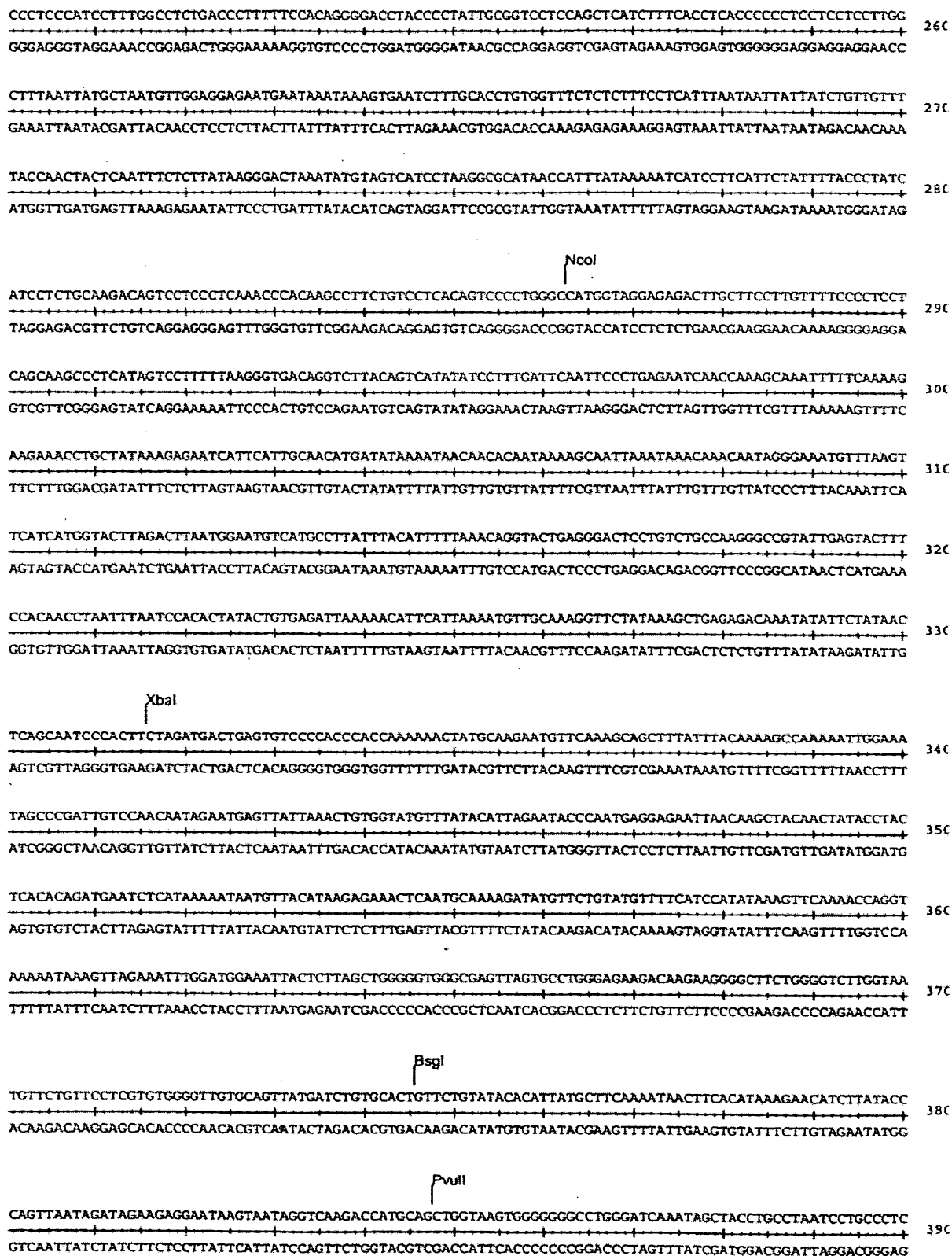


FIG. 13-3

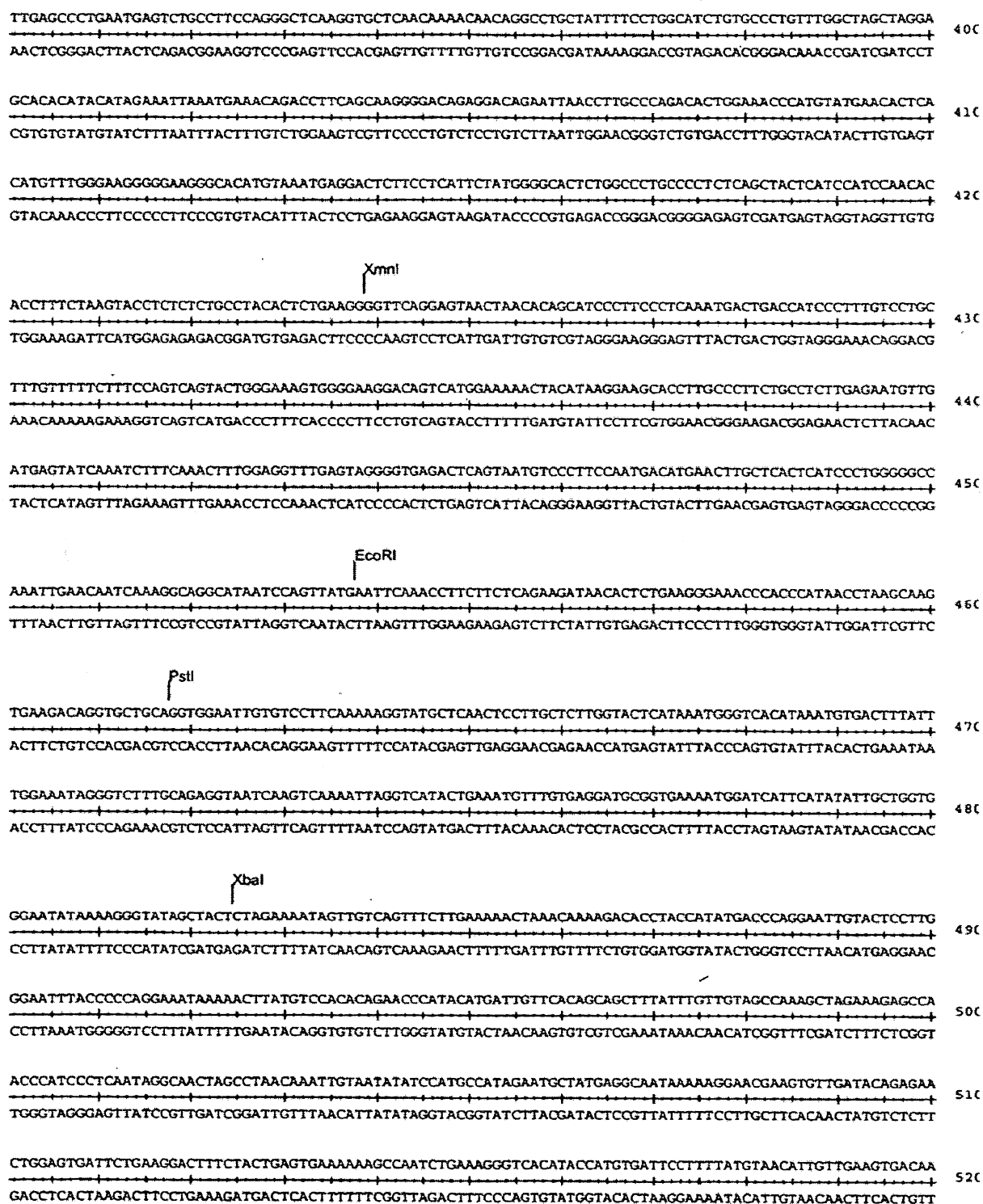


FIG. 13-4

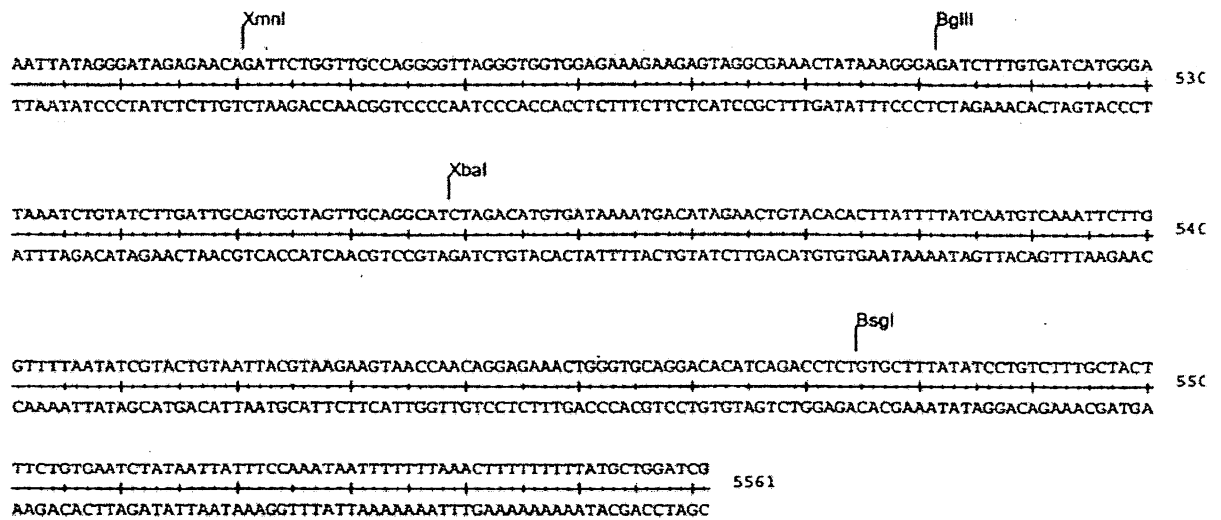


FIG. 13-5

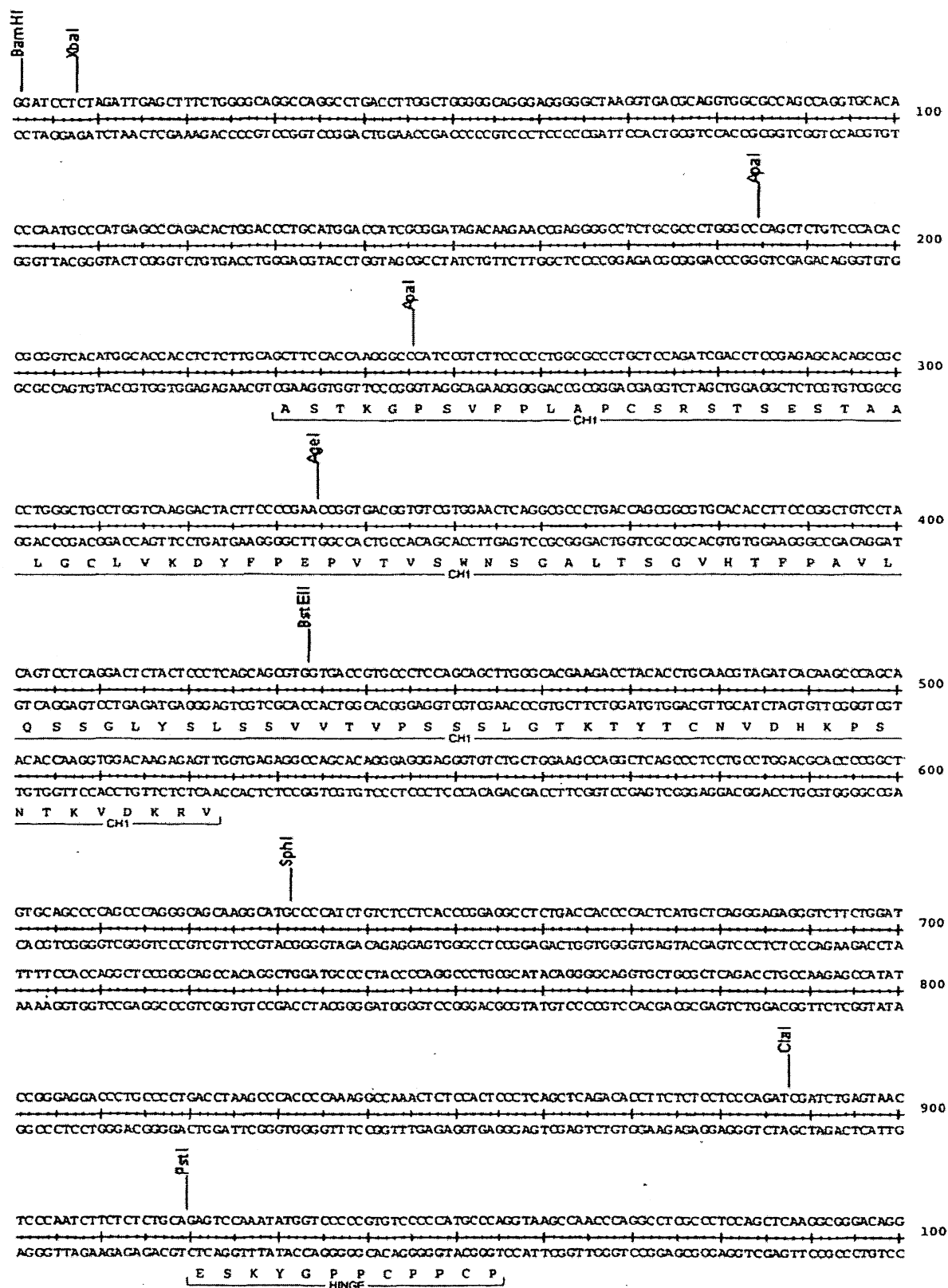


FIG. 14-1

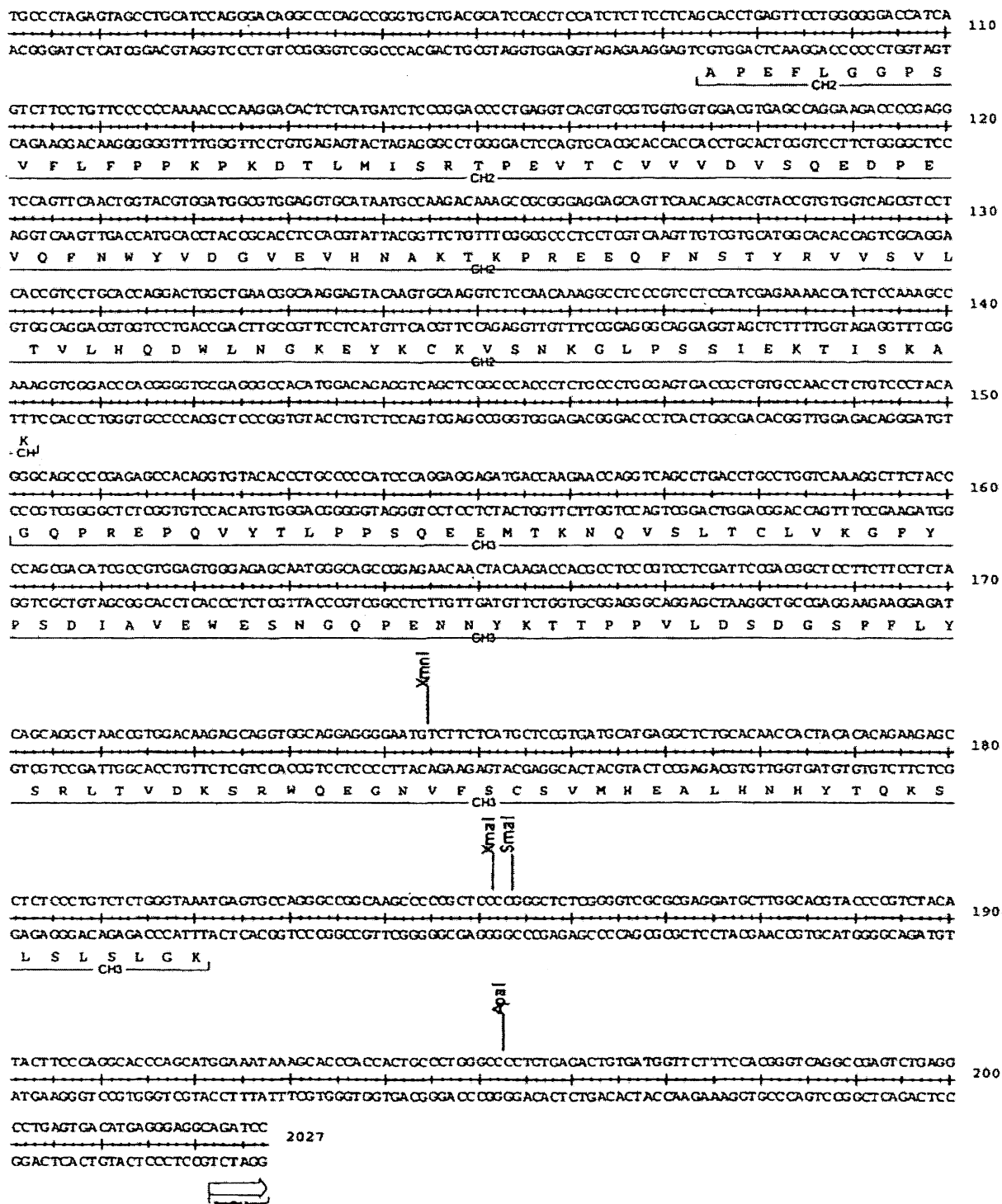


FIG. 14-2

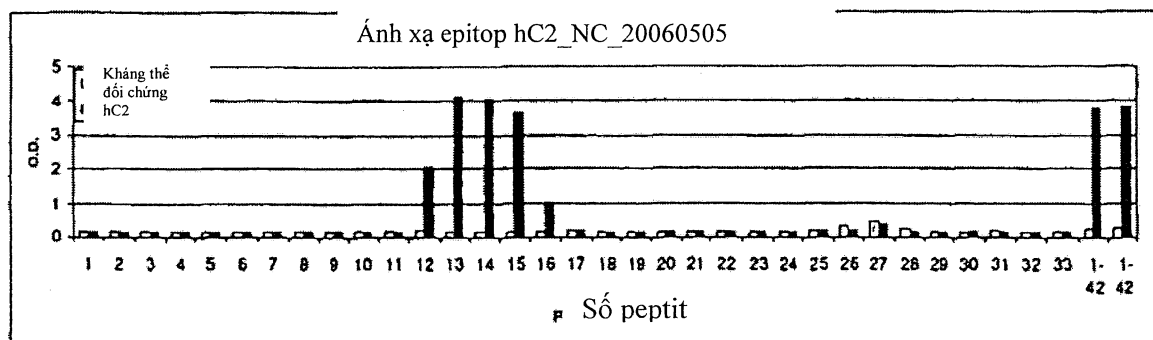


FIG 1. hC2 gắn kết với các peptit 12, 13, 14, 15 và 16 của thư viện peptit A β 1-42

Sự gắn kết của hC2 với các peptit chồng lấp của A β 1-42 được phân tích bằng ELISA. Sự gắn kết với A β 1-42 hoàn toàn và gắn kết của kháng thể dạng khảm không gắn kết (kháng thể đối chứng) được sử dụng như các đối chứng âm và dương tương ứng. Số peptit tương ứng với axit amin trong trình tự A β 1-42 trên đó peptit bắt đầu. Các kết quả được thể hiện như OD.

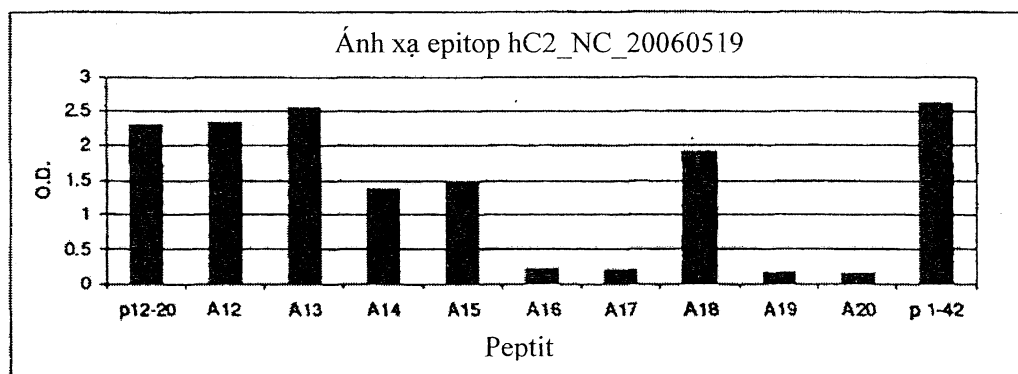


FIG 2. hC2 gắn kết với A β 12-20 phụ thuộc hoàn toàn vào aa 16, 17, 19 và 20 và phụ thuộc một phần vào aa 14, 15 và 18.

Sự gắn kết của hC2 với A β 12-20 và alanin được thể A β 12-20 được phân tích bằng ELISA. Sự gắn kết với A β 1-42 hoàn toàn được sử dụng như đối chứng dương. Số tương ứng với aa mà được thể bằng alanin. Các kết quả được thể hiện như OD.

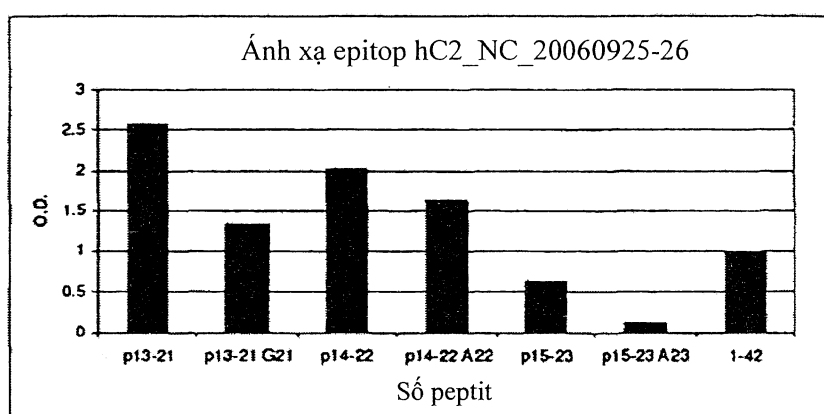


FIG 3. hC2 gắn kết với A β 15-23 phụ thuộc vào aa 23 và phụ thuộc một phần vào aa 21 và phụ thuộc một ít vào aa 22.

Sự gắn kết của hC2 với A β 13-21, 14-22 hoặc 15-23 và với 13-21G21, 14-22A22 hoặc 15-23A23 được phân tích bằng ELISA.

Sự gắn kết với A β 1-42 hoàn toàn được sử dụng như đối chứng dương. Các kết quả được thể hiện như OD.

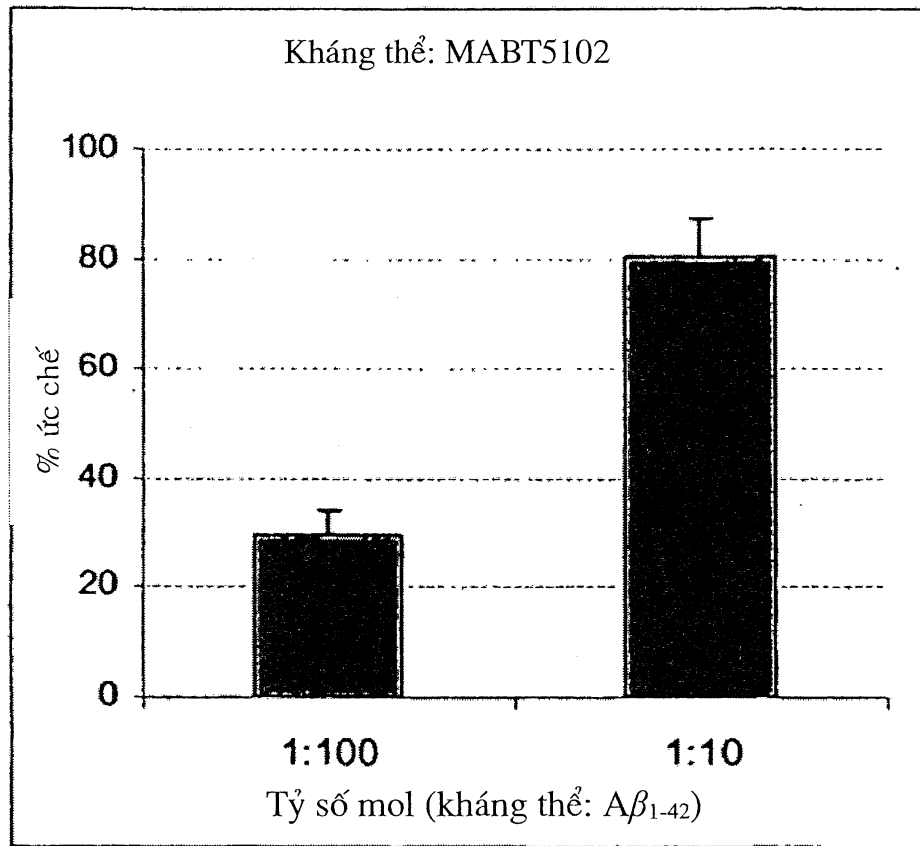


FIG. 16

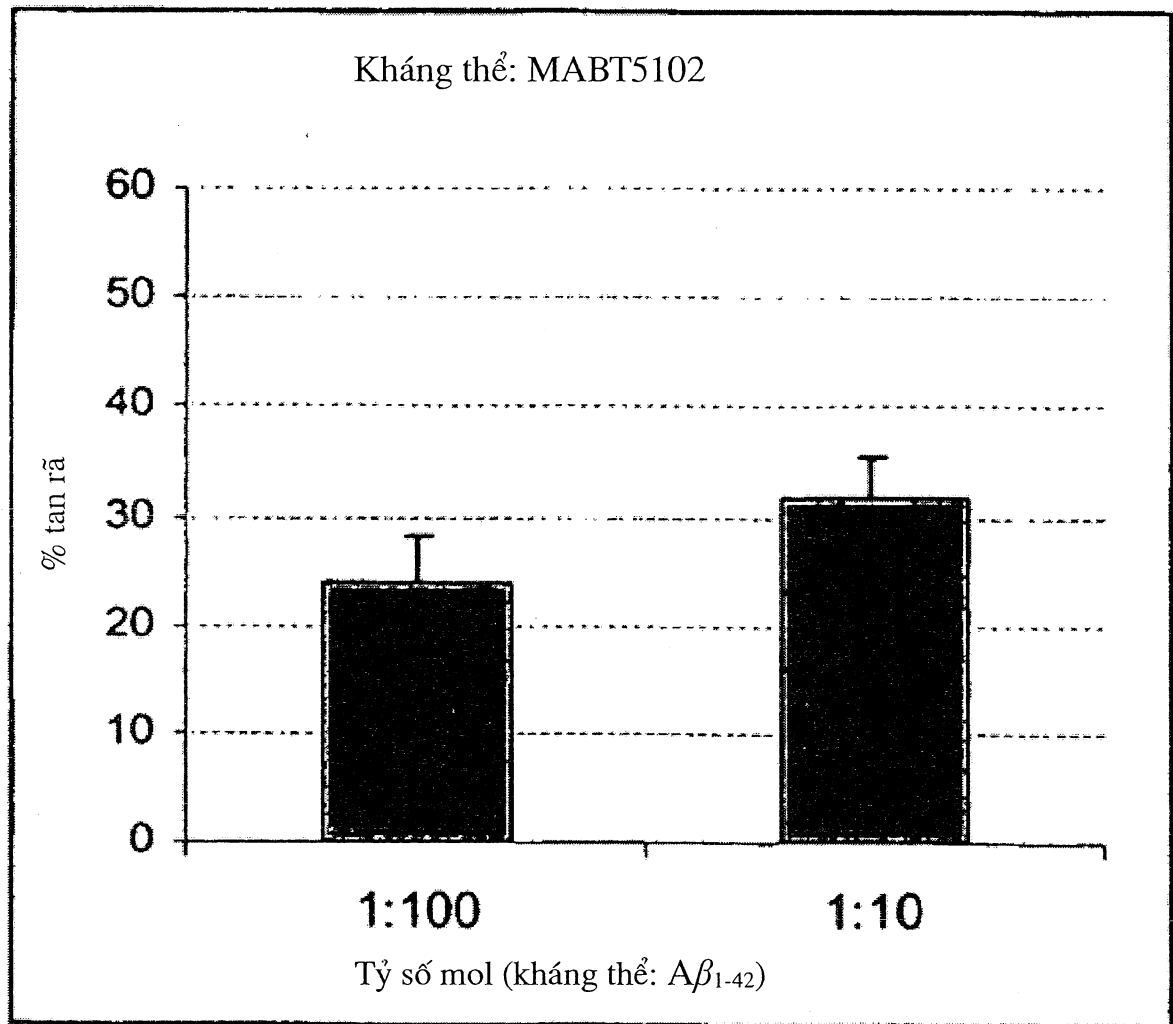


FIG. 17

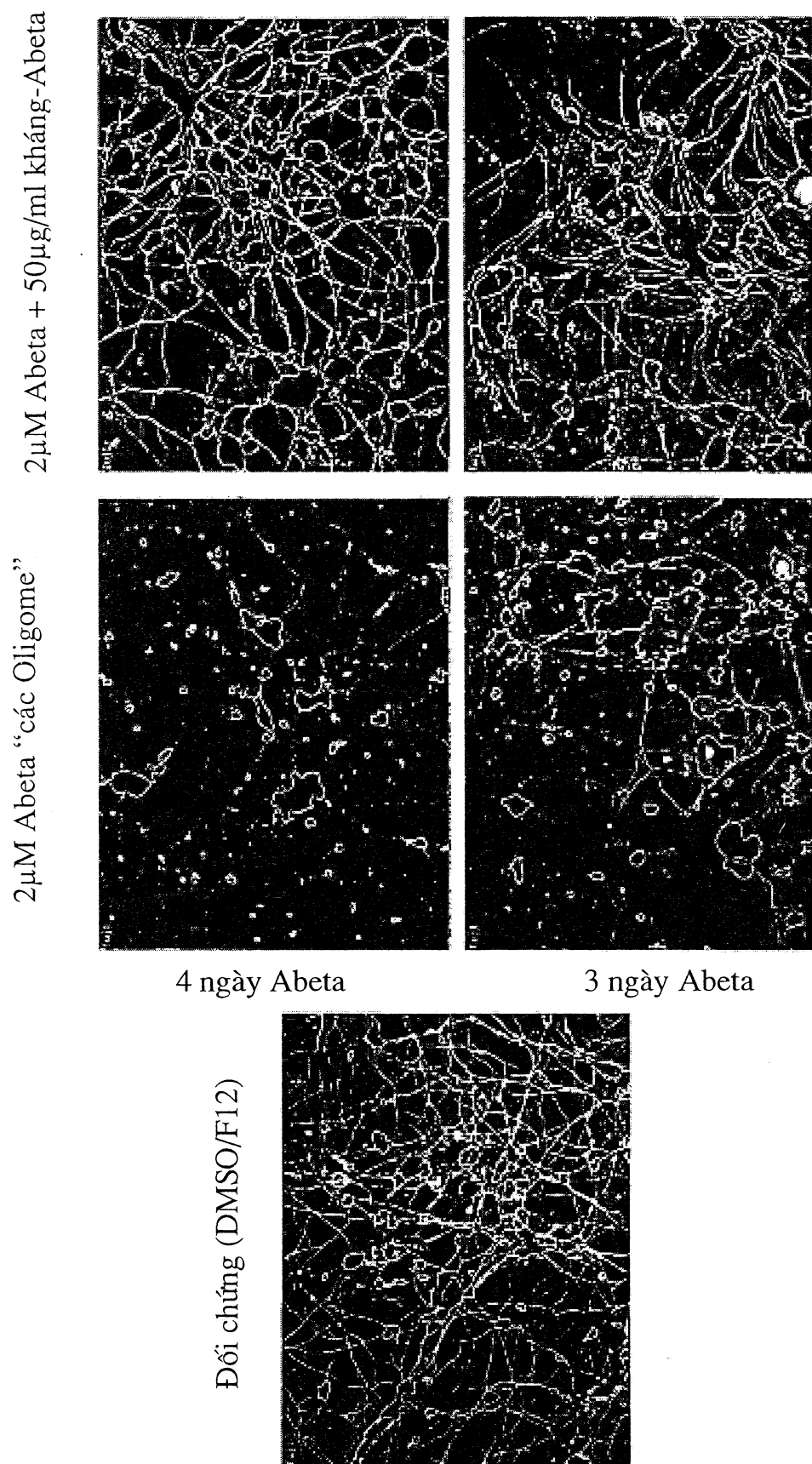


FIG. 18

Danh mục trình tự

<110> AC Immune S.A.

<110> Genentech, Inc.

<120> KHÁNG THỂ ĐỂ ĐIỀU TRỊ BỆNH THOÁI HÓA DẠNG TINH BỘT, DƯỢC PHẨM VÀ BỘ KIT ĐỂ PHÁT HIỆN VÀ CHẨN ĐOÁN BỆNH THOÁI HÓA DẠNG TINH BỘT BAO GỒM KHÁNG THỂ NÀY

<130> M1967 EP/A BS

<140> EP 07840408.4

<141> 2007-07-13

<150> EP 06014730.3

<151> 2006-07-14

<150> EP 06020765.1

<151> 2006-10-02

<150> US 60/943,289

<151> 2007-06-11

<150> US 60/943,499

<151> 2007-06-12

<160> 32

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 10

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 Vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người (CDR1)

<400> 1

Gly	Phe	Thr	Phe	Ser	Ser	Tyr	Gly	Met	Ser
1				5					10

<210> 2

<211> 17

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 Vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người (CDR2)

<400> 2

Ser	Ile	Asn	Ser	Asn	Gly	Gly	Ser	Thr	Tyr	Tyr	Pro	Asp	Ser	Val	Lys
1				5					10					15	

Gly

<210> 3

<211> 3

<212> PRT

<220>

<223> C2 HuVH AF 4 Vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người (CDR3)

<400> 3

Gly Asp Tyr
1

<210> 4

<211> 16

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<223> C2 HuVK 1 Vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người (CDR1)

<400> 4

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His
1 5 10 15

<210> 5

<211> 7

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<223> C2 HuVK 1 Vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người (CDR2)

<400> 5

Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser
1 5

<210> 6

<211> 9

<212> PRT

<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<223> C2 HuVK 1 Vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người (CDR3)

<400> 6

Ser Gln Ser Thr His Val Pro Trp Thr
1 5

<210> 7

<211> 6

<212> PRT

<213> Chủng người

<220>

<223> A-beta epitop, vùng 2

<400> 7

Val Phe Phe Ala Glu Asp
1 5

<210> 8
<211> 5
<212> PRT
<213> Chủng người

<220>
<223> A-beta epitop, vùng 1

<400> 8

His Gln Lys Leu Val
1 5

<210> 9
<211> 6
<212> PRT
<213> Chủng người

<220>
<221> Đặc trưng hỗn hợp
<222> (1)..(1)
<223> Xaa có thể là Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe, hoặc Ile

<220>
<221> Đặc trưng hỗn hợp
<222> (4)..(4)
<223> Xaa có thể là Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>
<221> Đặc trưng hỗn hợp
<222> (5)..(5)
<223> xaa có thể là Glu hoặc Asp

<220>
<221> Đặc trưng hỗn hợp
<222> (6)..(6)
<223> Xaa có thể là Glu hoặc Asp

<400> 9

Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5

<210> 10
<211> 5
<212> PRT
<213> Chủng người

<220>
<221> Đặc trưng hỗn hợp
<222> (1)..(1)
<223> Xaa có thể là His, Asn, Gln Lys, hoặc Arg

<220>
<221> Đặc trưng hỗn hợp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa có thể là Asn hoặc Gln

<220>

<221> Đặc trưng hỗn hợp

<222> (5)..(5)

<223> xaa có thể là Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe, hoặc Ile

<400> 10

Xaa Xaa Lys Leu Xaa

1

5

<210> 11

<211> 10

<212> PRT

<213> Chứng người

<220>

<221> Đặc trưng hỗn hợp

<222> (1)..(1)

<223> Xaa có thể là His, Asn, Gln Lys, hoặc Arg

<220>

<221> Đặc trưng hỗn hợp

<222> (2)..(2)

<223> Xaa có thể là Asn hoặc Gln

<220>

<221> Đặc trưng hỗn hợp

<222> (5)..(5)

<223> Xaa có thể là Ala, Val, Leu, norleucine, Met, Phe, hoặc Ile

<220>

<221> Đặc trưng hỗn hợp

<222> (8)..(8)

<223> Xaa có thể là Ala, Val, Leu, Ser hoặc Ile

<220>

<221> Đặc trưng hỗn hợp

<222> (9)..(9)

<223> Xaa có thể là Glu hoặc Asp

<220>

<221> Đặc trưng hỗn hợp

<222> (10)..(10)

<223> xaa có thể là Glu hoặc Asp

<400> 11

Xaa Xaa Lys Leu Xaa Phe Phe Xaa Xaa Xaa
1 5 10

<210> 12

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi biến đổi nhẹ C2 HuVK1 nhân tạo tương thích với người

<400> 12

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

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
20 25 30

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 13

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ C2 nhân tạo tương thích với người

<400> 13

Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro Gly
 1 5 10 15
 Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Val Tyr Ser
 20 25 30
 Asn Gly Asp Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser
 35 40 45
 Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Lys Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro
 50 55 60
 Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile
 65 70 75 80
 Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Ser Gln Ser
 85 90 95
 Thr His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110
 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> 14

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Vùng ổn định chuỗi nhẹ C2 nhân tạo tương thích với người

<400> 14

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> 15

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng biến đổi C2 HuVK AF 4 nhân tạo tương thích với người

<400> 15

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

<210> 16

<211> 439

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nặng C2 nhân tạo tương thích với người

<400> 16

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

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

Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
 420 425 430

Leu Ser Leu Ser Leu Gly Lys
 435

<210> 17

<211> 326

<212> PRT

<213> Chủng người

<220>

<223> Vùng C chuỗi IG GAMMA-4 – biến đổi

<400> 17

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Cys Ser Arg
 1 5 10 15
 Ser Thr Ser Glu Ser 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 Lys Thr
 65 70 75 80
 Tyr Thr Cys Asn Val Asp His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 85 90 95
 Arg Val Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro
 100 105 110
 Glu Phe Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys
 115 120 125
 Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val
 130 135 140
 Asp Val Ser Gln Glu Asp Pro Glu Val Gln Phe Asn Trp Tyr Val Asp
 145 150 155 160
 Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Phe
 165 170 175
 Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp
 180 185 190
 Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Gly Leu

195	200	205
Pro Ser Ser Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg		
210	215	220
Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Gln Glu Glu Met Thr Lys		
225	230	235
Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp		
245	250	255
Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys		
260	265	270
Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser		
275	280	285
Arg Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Glu Gly Asn Val Phe Ser		
290	295	300
Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser		
305	310	315
Leu Ser Leu Ser Leu Gly		
325		

<210> 18

<211> 51

<212> DNA

<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF 4 (CDR2)

<400> 18

agcatcaata gtaatggtgg tagcacctat tatccagaca gtgtgaagg c 51

<210> 19

<211> 9

<212> DNA

<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nặng được làm tương thích với người C2 HuVH AF 4 (CDR3)

<400> 19

ggtgactac 9

<210> 20

<211> 49

<212> DNA

<213> Chuột nhắt nhà

<220>

<223> Vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với người C2 HuVH 1 (CDR1)

<400> 20

agatctagtc agagccttgt atatagtaat ggagacacct atttacatt 49

<210> 21

<211> 336

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi biến đổi nhẹ C2 HuVK1 nhân tạo tương thích với người

<400> 21

gatattgtga tgaccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctcttggtga gcctgcctcc	60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg	120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctctgatctt acaaagtctt caaccgattt	180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc	240
agcagagtgg aggcctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct	300
tggacgttcg gccaaaggac caaggtggaa atcaaa	336

aggactgtgg ctgcaccatc tgtcttcac tccccgcat ctgatgagca gttgaaatct	60
ggaactgcct ctgttggtg cctgctgaat aacttctatc ccagagaggc caaagtacag	120
tggaagggtg ataacgccct ccaatcgggt aactcccagg agagtgtcac agagcaggac	180
agcaaggaca gcacctacag cctcagcagc accctgacgc tgagcaaagc agactacgag	240
aaacacaaag tctacgctg cgaagtcacc catcagggcc tgagctcgcc cgtcacaaag	300
agcttcaaca ggggagagtg t	321

<210> 22

<211> 657

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ C2 nhân tạo tương thích với người

<400> 22

```

gatattgtga tgacccaatc tccactctcc ctgcctgtca ctccctggtga gcctgcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gagccttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gtctccacag ctccctgatct acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggtcc cagacagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tgtgggagtt tattactgct ctcaaagtac acatgttcct      300
tggaagtctg gccaaaggcac caaggtggaa atcaaaagga ctgtggctgc accatctgtc      360
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      420
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtggga aggtggataa cgccctccaa      480
tcgggtaact cccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      540
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgccctgcgaa      600
gtcacccatc agggcctgag ctgcgccgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgt      657

```

<210> 23

<211> 321

<212> DNA

<213> Chúng người

<220>

<223> Vùng ổn định chuỗi nặng C2 nhân tạo tương thích với người

<400> 23

<210> 25

<211> 1317

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> chuỗi nhẹ C2 nhân tạo tương thích với người

<400> 25

```

gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct      120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat      180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac      240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac      300
tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctcagctt ccaccaaggg cccatccgtc      360
ttccccctgg cgccctgtc cagatcgacc tccgagagca cagccgccct gggctgcctg      420
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc      480
ggcgtgcaca ctttcccggc tgtcctacag tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg      540
gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacg aagacctaca cctgcaacgt agatcacaag      600
cccagcaaca ccaaggtgga caagagagtt gagtccaaat atgggtcccc gtgtccccc      660
tgcccagcac ctgagttcct ggggggacca tcagtcttcc tgttcccccc aaaaccaag      720

```

<210> 24

<211> 336

<212> DNA

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi biến đổi nặng C2 HuVK AF nhân tạo tương thích với người

<400> 24

```

gaggtgcagc tggctcgagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggaggggc cctgagactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccaggct      120
ccaggcaagg gtctcgaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggtag cacctattat      180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa ctccctgtac      240
ctgcaaatga acagtctgag agctgaggac accgccgtgt attactgtgc aagtgggtgac      300
tactggggcc aaggcaccac tgtcacagtc tcctca.                               336

```

gacactctca tgatctcccg gacccctgag gtcacgtgcg tgggtggtgga cgtgagccag 780
 gaagaccccg aggtccagtt caactggtac gtggatggcg tggaggtgca taatgccaaag 840
 acaaagccgc gggaggagca gttcaacagc acgtaccgtg tggtcagcgt cctcaccgtc 900
 ctgcaccagg actggctgaa cggcaaggag tacaagtgca aggtctccaa caaaggcctc 960
 ccgtcctcca tcgagaaaac catctccaaa gccaaagggc agcccccaga gccacagggtg 1020
 tacaccctgc ccccatccca ggaggagatg accaagaacc aggtcagcct gacctgcctg 1080
 gtcaaaggct tctaccccag cgacatcgcc gtggagtggg agagcaatgg gcagccggag 1140
 aacaactaca agaaccacgcc tcccgtcctc gattccgacg gctccttctt cctctacagc 1200
 aggctaaccg tggacaagag cagggtggcag gagggggaatg tcttctcatg ctccgtgatg 1260
 catgaggctc tgcacaacca ctacacacag aagagcctct ccctgtctct gggtaaa 1317

<211> 981

<212> DNA

<213> Chủng người

<220>

<223> Vùng ổn định chuỗi nặng C2 nhân tạo tương thích với người

<400> 26

gcttccacca agggcccatc cgtcttcccc ctggcgccct gctccagatc gacctccgag 60
 agcacagccg ccctgggctg cctgggtcaag gactacttcc ccgaaccggg gacgggtgtcg 120
 tggaaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180
 ggactctact ccctcagcag cgtgggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacgaagacc 240
 tacacctgca acgtagatca caagcccagc aacaccaagg tggacaagag agttgagtcc 300
 aaatatggtc ccccgtgtcc cccatgcccc gcacctgagt tcctgggggg accatcagtc 360
 ttcctgttcc ccccaaaacc caaggacact ctcatgatct cccggacccc tgagggtcacg 420
 tgcgtgggtg tggacgtgag ccaggaagac cccgaggtcc agttcaactg gtacgtggat 480
 ggcgtggagg tgcataatgc caagacaaag ccgcgggagg agcagttcaa cagcacgtac 540
 cgtgtgggtca gcgtcctcac cgtcctgcac caggactggc tgaacggcaa ggagtacaag 600
 tgcaagggtct ccaacaaagg cctcccgtcc tccatcgaga aaaccatctc caaagccaaa 660
 gggcagcccc gagagccaca ggtgtacacc ctgcccccat cccaggagga gatgaccaag 720
 aaccagggtc gcctgacctg cctgggtcaaa ggcttctacc ccagcgacat cgccgtggag 780
 tgggagagca atgggcagcc ggagaacaac tacaagacca cgcctcccgt cctcgattcc 840
 gacggctcct tcttctctta cagcaggcta accgtggaca agagcagggt gcaggagggg 900
 aatgtcttct catgtctcgt gatgcatgag gctctgcaca accactacac acagaagagc 960
 ctctccctgt ctctgggtaa a 981

<210> 27

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà
 <400> 27

```

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

```

<210> 28
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Chuột nhắt nhà
 <400> 28

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

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

Gly Met Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Asp Lys Arg Leu Glu Leu Val
35 40 45

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

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

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

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

<210> 29

<211> 336

<212> DNA

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 29

```

gatgttgtga tgacccaaac tccactctcc ctgcctgtca gtcttgagga tcaagcctcc      60
atctcttgca gatctagtca gaggcttgta tatagtaatg gagacaccta ttacattgg      120
tacctgcaga agccaggcca gtctccaaag ctctgatct acaaagtttc caaccgattt      180
tctgggggcc cagaçagggt cagtggcagt ggatcaggga cagatttcac actcaagatc      240
agcagagtgg aggctgagga tctgggagtt tatttctgct ctcaaagtac acatgttcct      300
tggacgttcg gtggaggcac caagctagaa atcaaa                                336

```

<210> 30

<211> 417

<212> DNA

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 30

```

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcttgcttc cagcagtgat      60
gttgtgatga cccaaactcc actctccctg cctgtcagtc ttggagatca agcctccatc      120
tcttgcatat ctagtcagag ccttgatatat agtaatggag acacctatctt acattggtac      180
ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatctaca aagtttccaa ccgattttct      240
ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc      300
agagtggagg ctgaggatct gggagtttat ttctgctctc aaagtacaca tggttccttg      360
acgttcggtg gaggcaccaa gctagaaatc aaacgggctg atgctgcacc aactgta      417

```

<211> 336

<212> DNA

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 31

```

gaggtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctatggca tgtcttgggt tcgccagact      120
ccagacaaga ggctggaatt ggtcgcaagc atcaatagta atggtggttag cacctattat      180
ccagacagtg tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctgtac      240
ctgcaaatga gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagtgggtgac      300
tactggggcc aaggctccac tctcacagtc tcctca      336

```

<210> 32

<211> 408

<212> DNA

<213> Chuột nhắt nhà

<400> 32

```

atgrasttsg ggytcagmtt grttttcctt gcccttattt taaaagggtg ccaatgtgag      60

gtgcagctgg tggagtcttg gggaggctta gtgcagcctg gagggtcctt gaaactctcc      120
tgtgcagcct ctggattcac ttccagtagc tatggcatgt cttgggttcg ccagactcca      180
gacaagaggc tgggaattggc cgcaagcatc aatagtaatg gtggtagcac ctattatcca      240
gacagtgtga agggccgatt caccatctcc agagacaatg ccaagaacac cctgtacctg      300
caaatgagca gtctgaagtc tgaggacaca gccatgtatt actgtgcaag tggtgactac      360
tggggccaag gctccactct cacagtctcc tcagccaaaa caacaccc      408

```