



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

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

(11) 
1-0022838

(51)⁷ C07K 16/18

(13) B

- (21) 1-2011-01916 (22) 21.12.2009
(86) PCT/EP2009/009186 21.12.2009 (87) WO2010/069603 24.06.2010
(30) 08022188.0 19.12.2008 EP
61/139,253 19.12.2008 US
(45) 27.01.2020 382 (43) 30.01.2012 286
(73) 1. BIOGEN INTERNATIONAL NEUROSCIENCE GMBH (CH)
Neuhofstrasse 30, 6340 Baar, Switzerland.
2. UNIVERSITY OF ZURICH (CH)
Prorektorat Forschung Ramistrasse 71 CH-8006 Zurich, Switzerland
(72) WEIHOFEN, Andreas (CH), GRIMM, Jan (DE), NITSCH, Roger (DE), HOCK,
Christoph (DE)
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG ALPHA-SYNUCLEIN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kháng α -synuclein của người cũng như các mảnh, các dẫn xuất và các biến thể của chúng và các phương pháp liên quan. Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp phân tích, kit, và chất mang rắn liên quan đến các kháng thể đặc hiệu với α -synuclein. Kháng thể, (các) chuỗi globulin miễn dịch, cũng như các mảnh liên kết, các dẫn xuất và các biến thể của nó có thể dùng trong dược phẩm và chế phẩm chẩn đoán để chẩn đoán và điều trị miễn dịch hướng đích α -synuclein, một cách tương ứng.

NI-202.3G12-VHB1 (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VHB1; SEQ ID NO:3)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
EVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNFI~~DFH~~HWVRQAPGEGLEWMGWSNPSQSGNSSAAQ
-----FR3-----CDR3-----JH-----
RFQGRVTMTTDTSMASAYMDLNWLTLD~~DTAVYYCTRFH~~DGAGN~~YRF~~DTWGQGT~~LVTVSS~~

NI-202.3G12-VHB1-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VHB1 so sánh với trình tự dòng tế bào gốc; SEQ ID NO:4)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
QVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNFI~~DFH~~HWVRQAPGEGLEWMGWSNPSQSGNSSAAQ
-----FR3-----CDR3-----JH-----
RFQGRVTMTTDTSMASAYMDLNWLTLD~~DTAVYYCTRFH~~DGAGN~~YRF~~DTWGQGT~~LVTVSS~~

NI-202.3G12-VLc1 (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VLc1, SEQ ID NO:6)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCSG~~DALPKHYA~~HWYQKPGQVP~~IVVIYK~~TERPSGIPERFS
-----CDR3-----JK-----
GSTSGTTVTLTISGVQAEDAHYYCQ~~SAD~~VSS~~TYVV~~FGGGTKLTVL

NI-202.3G12-VLc1-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VLc1 so sánh với trình tự dòng tế bào gốc; SEQ ID NO:7)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
SYELTQPPSVSVAPGQTARITCSG~~DALPKHYA~~HWYQKPGQVP~~IVVIYK~~TERPSGIPERFS
-----CDR3-----JK-----
GSTSGTTVTLTISGVQAEDAHYYCQ~~SAD~~VSS~~TYVV~~FGGGTKLTVL

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập chung đến các phân tử liên kết đặc hiệu với α -synuclein, cụ thể là các kháng thể của người cũng như các đoạn, các dẫn xuất và các biến thể của chúng mà nhận biết α -synuclein và các dạng kết tụ của α -synuclein, một cách tương ứng. Ngoài ra, sáng chế cũng đề cập đến được phẩm và chế phẩm chẩn đoán có chứa các phân tử liên kết, các kháng thể và các giả thể của chúng vừa làm công cụ chẩn đoán để xác định các dạng α -synuclein gây độc có trong huyết thanh và CSF, vừa đóng vai trò như một phương thức tiêm chủng thụ động để điều trị các bệnh rối loạn liên quan đến sự kết tụ của α -synuclein như là bệnh Parkinson (PD: Parkinson's disease), bệnh mất trí với thể Lewy (DLB: dementia with Lewy bodies) và các biến thể Lewy khác nhau của bệnh Alzheimer (AD: Alzheimer's disease) và những bệnh liên quan đến synuclein.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Việc kết tụ và gấp nếp sai của protein, về mặt bệnh lý, có liên quan đến nhiều căn bệnh thoái hóa thần kinh. Các α -synuclein kết tụ là thành phần chính của thể Lewy và sợi trục Lewy liên quan đến bệnh Parkinson. Khi ở dạng protein nguyên thủy chưa gấp nếp, α -synuclein có thể tồn tại ở các dạng kết tụ khác nhau, bao gồm các oligo, dạng nguyên sợi và dạng sợi. Các dạng kết tụ oligo nhỏ đã thể hiện độc tính đặc trưng.

Các kháng thể tự kháng xuất hiện trong tự nhiên kháng α -synuclein đã được tìm thấy trong các cá thể khỏe mạnh và các mức khác nhau trong những bệnh nhân liên quan đến các rối loạn thoái hóa thần kinh cụ thể; xem tổng quan: Neff et al., *Autoimmun. Rev.* 7 (2008), 501-507. Vì vậy, các kháng thể xuất hiện một cách tự nhiên ở bệnh nhân mắc bệnh Parkinson, hoặc là tự phát hoặc là do tiêm chủng vacxin, đặc biệt là trong bệnh nhân khỏe mạnh các kháng thể này có thể đóng vai trò bảo vệ về mặt kết tụ α -synuclein; ví dụ, xem: Woulfe et al., *Neurology* 58 (2002), 1435-1436 và Papachroni et al., *J. Neurochem.* 101 (2007), 749-756. Hiện nay, ý nghĩa của trị liệu của các kháng thể tự kháng vẫn chưa đánh giá được. Điều này chủ yếu là thiếu các tiếp cận thực nghiệm đủ khả năng để phân lập và tiếp đó là nhận dạng các kháng thể tự miễn *in vitro*.

Gần đây, các dạng oligo của α -synuclein ngoại bào trong huyết thanh và CSF đã được báo cáo (El-Agnaf et al., FASEB J. 20 (2006), 419–425), đồng thời các nghiên cứu miễn dịch trên các mẫu chuột bị mắc bệnh Parkinson đã cho thấy rằng các kháng thể đơn dòng ngoại bào của chuột kháng α -synuclein có thể làm giảm lượng kết tụ của α -synuclein nội bào (Masliah et al., Neuron, 46 (2005), 857–868), củng cố cho quan điểm là các kháng thể mà trung hòa các kết tụ gây độc thần kinh, nhưng không ảnh hưởng đến chức năng có lợi của α -synuclein đơn lẻ có thể là hữu ích trong việc điều trị bệnh. Tuy nhiên, ứng dụng điều trị bệnh trên người bằng kháng thể có nguồn gốc từ chuột vẫn gặp trở ngại do đáp ứng kháng thể của người kháng chuột (HAMA: human anti-mouse antibody) do kháng thể này không có nguồn gốc từ người.

Emadi và cộng sự, J. Mol. Biol. 368 (2007), 1132–1144, đã mô tả việc phân lập các đoạn kháng thể chuỗi đơn (scFvs: single chain antibody fragments) trong thư viện kháng thể biểu hiện thực khuẩn thể dựa trên các trình tự kháng α -synuclein của người, mà chỉ liên kết với dạng oligo của α -synuclein và đồng thời ức chế cả sự kết tụ và độc tính của α -synuclein *in vitro*. Tuy nhiên, mặc dù việc tạo ra scFvs từ biểu hiện thực khuẩn thể là khá đơn giản, nhưng kỹ thuật này có trở ngại do kháng thể được tạo ra như vậy mang nguy cơ gây ra phản ứng chéo không mong muốn kháng lại chính các kháng nguyên đó cũng như thiếu các đặc tính của kháng thể của người đã được tối ưu qua quá trình tiến hoá được tạo ra bởi hệ miễn dịch của người. Hơn thế nữa, những kháng thể như vậy lại không đủ đặc hiệu do phản ứng chéo với những protein khác và/hoặc với protein đích trong môi trường và chức năng sinh lý học bình thường. Lấy ví dụ, trong trường hợp đối với bệnh Parkinson, các kháng thể này phản ứng chéo với cả dẫn xuất sinh lý của α -synuclein có khả năng gây ra tác dụng phụ ảnh hưởng đến chức năng thông thường của các cấu trúc đích có chức năng sinh lý. Theo khía cạnh này, kháng thể có thể trực tiếp gây ra một bệnh tự miễn không mong muốn – cũng khó có thể tính toán được nguy cơ về lý thuyết của các thực nghiệm tiêm chủng chủ động sử dụng các cấu trúc protein mà ở dạng biến thể cũng biểu hiện chức năng sinh lý.

Gần đây, Seitz và cộng sự (81. Kongress der Deutschen Gesellschaft für Neurologie mit Fortbildungsakademie Hamburg 10.-13.09.2008), đã báo cáo phân lập được các kháng thể tự kháng đa dòng kháng α -synuclein từ dung dịch globulin miễn dịch và trong các mẫu máu hiến riêng biệt thông qua sắc ký ái lực. Tuy nhiên, bên cạnh một thực tế là cách tiếp cận này cho phép cung cấp một lượng giới hạn kháng thể

mong muốn thì các kháng thể đa dòng cũng chỉ được sử dụng một cách hạn chế để điều trị bệnh, lấy ví dụ, do tính hỗn tạp của chúng và nguy cơ bị gây nhiễm bởi các phân tử có liên quan đến α -synuclein khác mà có tác dụng phụ không mong muốn. Tương tự như vậy, các giá trị chẩn đoán của kháng thể đa dòng bị suy giảm do tính thay đổi của thành phần kháng thể có ảnh hưởng toàn bộ đến tính đặc hiệu và khả năng phản ứng của chúng. Đó là tất cả những điều chính xác đối với kháng thể chống lại sự kết tụ và lắng đọng của protein đối tượng do gấp nếp sai.

Vì vậy, có một nhu cầu nhằm giải quyết các hạn chế đã được chỉ ra ở trên và cung cấp kháng thể của người kháng α -synuclein để dùng trong chẩn đoán và điều trị bệnh.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đã tạo ra đáp ứng miễn dịch đặc hiệu với α -synuclein từ đối tượng và bệnh nhân được chăm sóc sức khỏe theo độ tuổi mắc bệnh thần kinh nhằm phân lập kháng thể đơn dòng của người đặc hiệu với α -synuclein tự nhiên. Cụ thể, các thực nghiệm được thực hiện theo sáng chế đã thành công trong việc phân lập kháng thể đơn dòng đặc hiệu với α -synuclein từ một nhóm đối tượng cao tuổi không có dấu hiệu mắc bệnh Parkinson.

Sáng chế cũng đề cập trực tiếp đến các kháng thể của người, các đoạn liên kết với kháng nguyên và các phân tử tương tự liên kết với kháng nguyên mà các phân tử này có khả năng nhận biết α -synuclein một cách đặc hiệu. Nói chung, bằng cách "nhận biết α -synuclein một cách đặc hiệu", "kháng thể đặc hiệu với/cho α -synuclein" và "kháng thể kháng α -synuclein" chỉ các kháng thể có tính đặc hiệu và tính chọn lọc đối với dạng nguyên thủy của α -synuclein, hoặc α -synuclein được cải biến sau dịch mã hoặc được kết tụ hoặc gấp nếp sai hoặc ở dạng oligo. Được đề cập theo sáng chế là các kháng thể của người có tính chọn lọc đối với các dạng đơn thể, dạng có chiều dài đầy đủ, dạng cắt ngắn và dạng kết tụ.

Trong một phương án ưu tiên cụ thể theo sáng chế, kháng thể của người hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của chúng thể hiện các đặc tính liên kết miễn dịch của kháng thể mà kháng thể này đặc trưng ở chỗ có vùng biến đổi V_H và/hoặc V_L như được mô tả trong Fig. 1.

Đoạn liên kết với kháng nguyên của kháng thể này có thể là một đoạn Fv chuỗi đơn, đoạn F(ab'), đoạn F(ab), và đoạn F(ab')₂, hoặc đoạn bất kỳ mà liên kết với kháng

nguyên. Trong một phương án cụ thể, sau đây, kháng thể hoặc mảnh của chúng là lớp kháng thể IgG của người. Ngoài ra, kháng thể này là kháng thể khảm chuột-người hoặc kháng thể được làm tương thích với chuột, kháng thể được làm tương thích với chuột này là đặc biệt hữu dụng trong các phương pháp chẩn đoán và nghiên cứu trên động vật.

Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các chế phẩm chứa kháng thể theo sáng chế hoặc các đoạn mang hoạt tính của chúng, hoặc các chất chủ vận và các phân tử có cùng nguồn gốc, hoặc theo cách khác, chất đối kháng của chúng và phương pháp chẩn đoán miễn dịch và điều trị miễn dịch bằng cách sử dụng chế phẩm theo sáng chế để ngăn ngừa, chẩn đoán hoặc điều trị bệnh gây ra bởi synuclein, trong đó một lượng hiệu quả của chế phẩm này được sử dụng cho bệnh nhân có nhu cầu.

Tất nhiên, sáng chế cũng bao gồm các tế bào lympho B nhớ bất tử của người và tế bào B, một cách tương ứng, mà các tế bào này sản sinh ra kháng thể có đặc tính khác biệt và duy nhất như được xác định dưới đây.

Sáng chế cũng đề cập đến các polynucleotit mã hóa ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn là vùng biến đổi này có chứa ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR: complementarity determining region) của V_H và/hoặc V_L của vùng biến đổi như được mô tả trong Fig 1.

Vì vậy, sáng chế cũng bao gồm các vector chứa các polynucleotit này và các tế bào chủ được biến nạp vector này cũng như việc sử dụng chúng để sản sinh ra kháng thể và các phân tử liên kết tương đương đặc hiệu với α -synuclein. Các công cụ và phương pháp tái tổ hợp sản xuất kháng thể và các giả thể của chúng cũng như các phương pháp sàng lọc các phân tử liên kết cạnh tranh, mà các phân tử này có thể là kháng thể mà cũng có thể không, là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Tuy nhiên, theo sáng chế, cụ thể là trên phương diện các ứng dụng trong điều trị bệnh cho người, kháng thể theo sáng chế là kháng thể của người theo nghĩa là áp dụng kháng thể này về cơ bản không có đáp ứng HAMA giống như khi quan sát đối với với kháng thể khảm và thậm chí là kháng thể được làm tương thích với người.

Hơn thế nữa, sáng chế còn bộc lộ các chế phẩm và các phương pháp sử dụng để xác định α -synuclein trong mẫu. Kháng thể kháng α -synuclein được mô tả này có thể được sử dụng để sàng lọc máu người, CSF, và nước tiểu để phát hiện xem có hay không có mặt α -synuclein trong mẫu, lấy ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp phân

tích tương thích bề mặt hay ELISA cơ sở. Các phương pháp và chế phẩm được bộc lộ theo sáng chế có thể hỗ trợ trong việc chẩn đoán bệnh liên quan đến synuclein như là bệnh Parkinson và có thể sử dụng để kiểm soát tiến triển của bệnh và kiểm soát hiệu quả điều trị bệnh.

Như được minh họa trong Ví dụ 4, kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế có khả năng cải thiện hiệu suất hoạt động và phản ứng đối với các chất tác động thần kinh (elevated plus maze) trên mẫu chuột chuyển gen mắc bệnh Parkinson. Các kết quả này đã xác thực giá trị điều trị mong đợi của kháng thể kháng α -synuclein có nguồn gốc từ người theo sáng chế.

Do đó, mục đích cụ thể theo sáng chế là đề xuất các phương pháp ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh liên quan đến synuclein như là bệnh Parkinson (PD: Parkinson's disease), bệnh mất trí Parkinson (PDD: Parkinson's Disease Dementia), mất trí thể Lewy (DLB: dementia with Lewy bodies), các biến tướng thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD: Lewy body variant of Alzheimer's disease), teo cơ đa hệ thống (MSA: multiple systems atrophy), suy chức năng thần kinh tự chủ đơn thuần (PAF: pure autonomic failure), thoái hóa thần kinh với sự tích tụ sắt trong não typ-1 (NBIA-I: neurodegeneration with brain iron accumulation type-1), bệnh Alzheimer, bệnh Pick, đau cơ mô sợi trục thần kinh khởi phát vị thành niên (bệnh Hallervorden-Spatz), bệnh xơ cứng teo cơ một bên, chấn thương não và hội chứng Down. Phương pháp này bao gồm việc sử dụng một nồng độ hữu hiệu kháng thể của người hoặc dẫn xuất kháng thể của người cho đối tượng, trong đó đích kháng thể là α -synuclein.

Các phương án khác theo sáng chế sẽ được đưa ra trong phần mô tả chi tiết và các phần ví dụ dưới đây.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1: Các trình tự axit amin và nucleotit của vùng biến đổi, nghĩa là chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kappa/lambda của kháng thể NI-202.3G12 (A), NI-202.12F4 (B) và NI-202.3D8 (C) của người. Đối với kháng thể NI-202.3D8 của người, hai trình tự biến đổi chuỗi nhẹ VKa1 (C) và VKc1 (D) đã được nhân dòng, từng trình tự này có thể được so sánh với trình tự biến đổi chuỗi nặng VHE1 (C). Vùng khung hoạt động (FR) và vùng biến đổi xác định bổ trợ (CDR) được chỉ ra với các CDR được gạch chân. Vùng kết hợp chuỗi nặng (JH) và vùng kết hợp chuỗi nhẹ (JK) cũng được chỉ rõ. Tùy thuộc vào cách nhân dòng trình tự axit amin tại đầu N của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có khả năng

chứa các biến đổi do môi trường trong FR1, tuy nhiên các biến đổi này về cơ bản không ảnh hưởng đến hoạt tính sinh học của kháng thể. Với mục đích cung cấp kháng thể liên ứng của người, trình tự axit amin và nucleic của dòng gốc được so sánh và điều chỉnh tương ứng với các trình tự vùng biến đổi của dòng tế bào gốc thích hợp của người trong cơ sở dữ liệu; ví dụ, xem: Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) tại máy chủ của Trung tâm kỹ thuật protein MRC (Cambridge, UK). Các axit amin mà có khả năng thu được từ trình tự dòng mầm liên ứng và do đó có thể thích hợp làm mẫu chạy PCR, là được chỉ ra với ký tự in đậm.

Fig. 2: Các kháng thể tái tổ hợp α -synuclein của người trực tiếp kháng các epitop riêng biệt. Các α -synuclein tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ và dạng cấu trúc được phủ lên đĩa ELISA với nồng độ phủ tương ứng ($20\mu\text{g/ml}$). (A) Kháng thể tái tổ hợp NI-202.3G12 α -synuclein của người liên kết với α -synuclein có chiều dài đầy đủ, nhưng không liên kết với α -synuclein bị cắt ngắn trong phân tích ELISA trực tiếp, điều này đã chỉ ra epitop nhận biết cấu trúc của NI-202.3G12. (B) NI-202.12F4 tái tổ hợp liên kết với α -synuclein có chiều dài đầy đủ và α -synuclein bị cắt ngắn bao gồm các axit amin (aa) 1-60 trong phân tích ELISA trực tiếp, chỉ ra epitop của NI-202.12F4 trong vùng lặp vừa ái nước vừa kỵ nước tại đầu N của α -synuclein. (C) Kháng thể LB509 liên kết với đầu C của các đoạn α -synuclein khẳng định epitop được xác định trước đó (aa 115-122). Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SEM ($n=2-3$).

Fig. 3: Các kháng thể tái tổ hợp α -synuclein của người liên kết với α -synuclein nhưng không liên kết với β - và γ -synuclein trong phân tích ELISA trực tiếp. Các dạng α -, β - và γ -synuclein tái tổ hợp được phủ lên đĩa ELISA với nồng độ phủ tương ứng ($2\mu\text{g/ml}$) được ủ với các kháng thể tái tổ hợp α -synuclein của người hoặc ủ với kháng thể pan-synuclein. (A) Kháng thể pan-synuclein phát hiện tất cả ba protein synuclein trong khi kháng thể tái tổ hợp α -synuclein của người (B) NI-202.3G12 và (C) NI-202.12F4 (C) liên kết một cách chọn lọc với α -synuclein. Các giá trị là giá trị trung bình $\pm$ SEM ($n=2-3$).

Fig. 4: Kháng thể tái tổ hợp NI-202.12F4 α -synuclein của người liên kết với α -synuclein, nhưng không liên kết với β và γ -synuclein trong phân tích thẩm tách Western. Các dạng α , β và γ -synuclein tái tổ hợp (mỗi loại 750ng) được phân tích bằng SDS-PAGE và tiếp đó đưa vào phân tích thẩm tách Western. (A) Thuốc nhuộm Coomassie thể hiện nồng độ protein bằng nhau trên SDS-PAGE. (B) NI-202.12F4 liên

kết mạnh với dạng α -synuclein nhưng không liên kết với dạng beta hoặc gamma synuclein. (C) Không phát hiện được tín hiệu khi không có kháng thể sơ cấp.

Fig. 5: (A) Phân tích miễn dịch điểm NI-202.12F4 từ các dịch chiết não chuột được chuyển và không được chuyển gen α -synuclein của người cho thấy một sự liên kết ưu tiên với α -synuclein của người. Các dịch chiết não chuột kiểu dại và từ chuột được chuyển gen α -synuclein của người được phân tích bằng phân tích miễn dịch điểm với kháng thể α -synuclein LB509 đặc hiệu của người, kháng thể dòng 42 tái hoạt hóa α -synuclein tái hoạt hóa dòng 42 của người và chuột và NI-202.12F4. Trong khi dòng 42 phát hiện được dải rõ nét tương ứng với α -synuclein của người và chuột, LB509 và NI-202.12F4 thể hiện một ái lực mạnh hơn đối với α -synuclein của người. (B) Phân tích miễn dịch điểm NI-202.12F4 từ dịch chiết não thể hiện ái lực liên kết với α -synuclein kết tụ của người. Dịch chiết vỏ não từ đối tượng đối chứng khỏe mạnh và bệnh nhân mất trí thể Lewy (DLB) cũng như dịch chiết não từ chuột chuyển gen kiểu dại và dạng được chuyển α -synuclein A30P của người được phân tích bằng phương pháp thấm tách Western. NI-202.12F4 phát hiện các dạng oligo và dạng sợi của α -synuclein kết tụ trong DLB và trong dịch chiết não chuột được chuyển gen α -synuclein A30P với độ nhạy cao. Liên kết tối thiểu thu được với dạng đơn thể của α -synuclein trong mô của người hoặc chuột kiểu dại và liên kết vừa phải thu được với dịch chiết não chuột được chuyển gen α -synuclein A30P có biểu hiện α -synuclein quá mức. Ngược lại, kháng thể dòng 42 phát hiện các dạng đơn thể và các đoạn α -synuclein với độ nhạy cao và liên kết kém với các mảnh α -synuclein bị kết tụ.

Fig. 6: NI-202.12F4 tái tổ hợp thể hiện ái lực liên kết cao với kiểu dại và các thể đột biến mắc bệnh mang α -synuclein của người. Kiểu dại tái tổ hợp ($\bullet$), A53T ($\blacksquare$), A30P ($*$) và α -synuclein E64K đột biến của người ($\diamond$) được phủ lên các đĩa ELISA ($2\mu\text{g/ml}$) và được dò với các nồng độ NI202.12F4 khác nhau. Nồng độ hiệu quả bán phân cao nhất (EC_{50}) là 321pM đối với α -synuclein kiểu dại, 293pM đối với A53T, 228pM đối với A30P và 483pM đối với α -synuclein E64K đột biến của người.

Fig. 7: Phân tích liên kết hóa mô miễn dịch của NI-202.12F4. NI-202.12F4 thể hiện nhuộm màu rõ nét α -synuclein bệnh học bao gồm thể Lewy và sợi trục Lewy tương tự thể vùi cũng như các tích lũy của tế bào soma hình cây và α -synuclein tiếp hợp trong các phần nổi tự do từ chuột chuyển gen có biểu hiện A53T (A) hoặc A30P α -synuclein (B) của người cũng như trong mô não của người mắc bệnh Parkinson (C)

và mất trí thể Lewy (D). Kháng thể Syn211 phát hiện α -synuclein tiếp hợp sinh lý với độ nhạy cao trong chuột chuyển gen α -synuclein A30P của người (E) trong khi NI-202.12F4 liên kết ưu tiên với α -synuclein kết tụ bệnh lý (B). Liên kết của NI-202.12F4 không hề xuất hiện trong các phần dịch não chuột kiểu dại (F), có thể so được với kháng thể thứ cấp chỉ nhuộm đối chứng (G) trong khi đó kháng thể dòng 42 cho thấy màu nhuộm tiếp hợp rõ nét với protein α -synuclein của chuột (H).

Fig. 8: NI-202.12F4 tái tổ hợp thể hiện liên kết ưu tiên với α -synuclein được phủ với mật độ cao. Các α -synuclein tái tổ hợp có chiều dài đầy đủ hoặc cắt ngắn được phủ lên đĩa ELISA với nồng độ được chỉ định và được dò với các nồng độ kháng thể NI-202.12F4 hoặc Syn211 khác nhau bằng ELISA trực tiếp (nồng độ phủ của α -synuclein có chiều dài đầy đủ hoặc cắt ngắn 1-60 là ○ 20 μ g/ml; ▲ 2 μ g/ml; ▼ 1 μ g/ml; ◆ 250ng/ml; ■ 100ng/ml). Nồng độ hiệu quả bán phần cao nhất (EC50) chỉ hiệu lực của kháng thể được xác định. (A) Ái lực liên kết cao của NI-202.12F4 tái tổ hợp với α -synuclein cần mật độ protein α -synuclein phủ cao. Trong khi EC50 là 111pM đã quan sát được đối với α -synuclein được phủ với nồng độ 20 μ g/ml, các giá trị EC50 tăng lên một cách nhanh chóng, khi giảm nồng độ phủ cho thấy rằng ái lực giảm đi rõ rệt với nồng độ phủ α -synuclein thấp hơn. Các giá trị này đã chỉ ra cấu hình epitop của NI-202.12F4 phù hợp hơn khi được hình thành với nồng độ α -synuclein cao. (B) Liên kết của Syn211 không bị ảnh hưởng bởi nồng độ phủ. Ái lực của kháng thể thương mại Syn211 không bị giảm tại các mật độ phủ thấp hơn với các EC50 trong khoảng từ 335pm đối với 20 μ g/ml đến 99pM đối với 100ng/ml mật độ phủ của α -synuclein, điều này cho thấy rằng chúng liên kết với epitop không có cấu hình dạng thẳng. (C) Ái lực liên kết cao của NI-202.12F4 tái tổ hợp với đầu N đoạn α -synuclein bao gồm các axit amin 1-60 cần có các mật độ phủ cao. NI-202.12F4 cho thấy giá trị tương ứng và nồng độ phủ phụ thuộc vào sự liên kết với α -synuclein có chiều dài đầy đủ hoặc bị cắt ngắn, chỉ ra rằng chúng liên kết với epitop cấu hình của NI-202.12F4 mà epitop này chứa khoảng 1-60 axit amin của protein α -synuclein. (D) Các peptit được biotin hóa có chứa đoạn 20 axit amin trùng lặp trong số 60 axit amin tại đầu N của α -synuclein đã được phủ trên đĩa chứa avidin và được dò với NI-202.12F4 hoặc pan-synuclein đối chứng để phát hiện epitop trong các axit amin 21-40. Vì vậy, kháng thể đối chứng liên kết mạnh với peptit 21-40 và kém hơn với các peptit 11-30 và 31-50. Ngược lại, không thấy có liên kết của NI-202.12F4 với peptit bất kỳ được kiểm tra, điều này cho thấy rằng

không có đoạn nào trong số các đoạn đầu N có đủ khả năng như epitop NI-202.12F4 và các đoạn lớn hơn có thể liên kết tối ưu để cấu thành epitop cấu trúc NI-202.12F4.

Fig. 9: Điều trị thường xuyên với NI-202.12F4 để cải thiện hoạt động vận động đối với chuột chuyển gen α -synuclein A53T. Chuột 10,5 tháng tuổi được chuyển gen α -synuclein A53T được điều trị hàng tuần với NI-202.12F4 hoặc PBS (5mg/kg; dùng trong màng bụng). Hoạt động vận động được ước định sau hai tháng điều trị bằng phương pháp Pole-Test. (A) Động vật được điều trị bằng NI-202.12F4 cần lượng thời gian ít hơn đáng kể để đi xuống (t- hoạt động; $1,7 \pm 0,3$ so với $4,6 \pm 0,6$ giây, $p=0,0002$, giá trị Student t-test hai phía). (B) Động vật được điều trị bằng NI-202.12F4 cũng cần thời gian ít hơn đáng kể (t-tổng) để đến chuồng ở ($7,3 \pm 0,9$ so với $10,4 \pm 0,7$ giây, $p=0,012$, giá trị Student t-test hai phía).

Fig. 10: Chuột chuyển gen α -synuclein A53T được điều trị lâu dài bằng NI-202.12F4 dẫn đến sự phục hồi phản ứng đối với các chất tác động thần kinh. Chuột 10,5 tuần tuổi được chuyển gen α -synuclein A53T được điều trị hàng tuần với liều lượng NI-202.12F4 hoặc PBS 5mg/kg. Sau hai tháng điều trị, những con chuột này được thử nghiệm phản ứng đối với các chất tác động thần kinh. Chuột được điều trị bằng NI-202.12F4 cần thời gian ít hơn đáng kể và bao gồm khoảng cách nhỏ hơn đáng kể trong các cánh mở so với chuột được điều trị bằng chất dẫn thuốc biểu lộ sự phục hồi tập tính hoạt động bình thường.

Fig. 11: Chuột chuyển gen NI-202.12F4 được điều trị lâu dài bằng α -synuclein A53T dẫn đến các mức α -synuclein A53T tăng lên trong huyết thanh. Các mẫu huyết thanh thu được từ chuột 12,5 tháng tuổi được chuyển gen α -synuclein A53T được điều trị hàng tuần theo đường trong màng bụng trong hai tháng với liều lượng NI-202.12F4 hoặc PBS 5mg/kg. Thu mẫu máu sau 24 giờ sử dụng cuối cùng. (A) Các mức NI-202.12F4 trong huyết thanh được xác định bằng cách sử dụng ELISA α -synuclein trực tiếp. (B) Các mức α -synuclein A53T của người được xác định bằng cách sử dụng ELISA đặc hiệu dạng kẹp với α -synuclein đặc hiệu cho người. Chuột được điều trị bằng NI-202.12F4 tăng đáng kể các mức α -synuclein của người trong huyết thanh so với chuột đối chứng ($24,9 \pm 4,1$ so với $1,9 \pm 1,2$ ng/ml, $p=0,0002$).

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

Những bệnh gây ra bởi synuclein hoặc bệnh liên quan đến synuclein là một nhóm

bao gồm rất nhiều bệnh rối loạn do thoái hóa thần kinh mà có thương tổn bệnh lý chung, bao gồm kết tụ protein α -synuclein không hòa tan trong tập hợp tế bào thần kinh và tế bào thần kinh đệm dễ bị tổn thương một cách chọn lọc. Các rối loạn này bao gồm bệnh Parkinson (PD: Parkinson's disease), mất trí do bệnh Parkinson (PDD: Parkinson's Disease Dementia), mất trí thể Lewy (DLB: dementia with Lewy bodies), đau cơ mô sợi trục thần kinh khởi phát vị thành niên (bệnh Hallervorden-Spatz), suy chức năng thần kinh tự chủ đơn thuần, teo cơ đa hệ thống và thoái hóa thần kinh với sự tích tụ sắt trong não typ-1. Về phương diện lâm sàng, các bệnh trên có đặc trưng ở chỗ là các bệnh kinh niên và làm suy giảm tiến triển chức năng vận động, nhận thức, tập tính, và chức năng kiểm soát, tùy theo mức độ các thương tổn.

Bệnh Parkinson là một bệnh thoái hóa thần kinh theo độ tuổi không rõ nguyên nhân. Người ta tin rằng, bệnh một số bệnh Parkinson là do kết hợp các chấn thương từ môi trường bên ngoài và thương tổn di truyền. Người ta cũng tin rằng, bệnh Parkinson (PD), mặc dù bị gây ra bởi rất nhiều cơ chế khác nhau, nhưng lại có chung một cơ chế bệnh lý. Một điểm mấu chốt chung là do thương tổn của α -synuclein. Mối liên hệ giữa protein này với cơ chế sinh bệnh học của bệnh Parkinson đã được thiết lập bằng cách xác định cả bằng gây các đột biến điểm và tăng ba lần gen này trong các trường hợp thông thường, với việc định vị α -synuclein với các thể Lewy, một trong những dấu hiệu rõ ràng về mặt bệnh lý của bệnh Parkinson, và với sự biểu hiện tương ứng của α -synuclein và bệnh lý của bệnh này trong các mô hình gây độc thần kinh của bệnh Parkinson. Bằng chứng khác chỉ ra rằng các dạng α -synuclein cụ thể (ví dụ, gấp nếp sai) và dopamin liên kết với α -synuclein) cũng có liên quan đến một số trường hợp mắc bệnh.

Synuclein là các protein nhỏ, có thể hòa tan được biểu hiện chủ yếu trong mô thần kinh và trong các khối u cụ thể. Họ synuclein này bao gồm ba loại protein đã biết là α -synuclein, β -synuclein, và γ -synuclein. Cả ba loại synuclein này đều chứa chung một vùng motif liên kết với lipid có cấu trúc cuộn xoắn α có độ bảo toàn cao tương tự với các vùng liên kết lipid lớp A2 của các apolipoprotein có thể trao đổi được. Các thành viên của họ synuclein không tìm thấy ngoài các động vật có xương sống, mặc dù chúng có một số cấu trúc bảo toàn giống với các protein “phần dư giai đoạn muộn của phôi” thực vật. Các protein α và β -synuclein về cơ bản được tìm thấy trong mô não, trong đó chúng chủ yếu được thấy tại các đầu trước khớp thần kinh. Protein γ -

synuclein chủ yếu được tìm thấy trong hệ thần kinh ngoại biên và võng mạc, nhưng sự biểu hiện của chúng trong các khối u vú lại là chỉ thị đối với tiến triển của khối u. Các chức năng tế bào thông thường không xác định được đối với protein synuclein bất kỳ, mặc dù một số dữ liệu đã đề xuất một vai trò trong việc điều hòa sự ổn định của màng và/hoặc lượng protein này. Các đột biến trong α -synuclein liên quan đến các trường hợp thường hiếm gặp trước khi phát bệnh Parkinson, và sự tích tụ protein một cách bất thường đối với bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, và một số bệnh thoái hóa thần kinh khác. Về tổng quan, ví dụ, xem: George, *Genome Biol.* 3 (2002), reviews 3002.1–reviews 3002.6 công bố trực tuyến 20/12/2001, trong đó các danh mục trong Bảng 1 là các thành viên duy nhất của họ synuclein này mà đã được liệt kê gần đây trong Ngân hàng gen, nội dung bộc lộ của tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

α -synuclein được xác định ban đầu trong não người như là protein tiền thân của thành phần không chứa β -amyloid (NAC: none-amyloid component) của bệnh Alzheimer (AD); ví dụ, xem: Ueda et al, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 90 (1993), 1282-1286. α -synuclein, mà cũng được cho là tiền thân của thành phần không chứa A β của amyloid AD (NACP), là một protein có 140 axit amin. α -synuclein tồn tại ở dạng nguyên thủy của nó như một cuộn xoắn ngẫu nhiên, tuy nhiên, tất cả sự thay đổi độ pH, tập hợp phân tử, thành phần kim loại nặng, và các mức dopamin đều ảnh hưởng đến cấu hình protein này. Sự thay đổi cấu hình với các dạng oligo, tiền sợi, dạng sợi, và các gốc kết tụ cũng điều hòa độc tính của protein này. Các bằng chứng dần dần đã chỉ ra rằng α -synuclein kẹp dopamin làm rút ngắn thời gian hình thành dạng sợi khi so sánh với protein không kẹp dopamin. Hơn thế nữa, dopamin trong nền α -synuclein khi biểu hiện quá mức sẽ trở thành độc tố.

Theo sáng chế, thuật ngữ " α -synuclein", "alpha-synuclein", "a-synuclein" và "aSyn" được sử dụng thay thế cho nhau chỉ α -synuclein dạng đơn thể nguyên thủy cụ thể. Thuật ngữ " α -synuclein" cũng được sử dụng chung để xác định phản thích ứng khác của α -synuclein, lấy ví dụ, α -synuclein liên kết với dopamin-quinon (DAQ) và các oligo hoặc dạng kết tụ của α -synuclein này. Thuật ngữ " α -synuclein" cũng được sử dụng để chỉ chung tất cả các typ và các dạng α -synuclein. Trình tự protein α -synuclein của người là: MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVVHGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKDQLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEP EA (SEQ

ID NO: 1). Trình tự axit amin của α -synuclein có thể thu được từ các bài báo và các cơ sở dữ liệu có liên quan; ví dụ, xem: Ueda et al., *ibid.*; GenBank swissprot: locus SYUA_HUMAN, số truy cập P37840. Thành phần không phải A β của amyloid AD (NAC) có nguồn gốc từ α -synuclein. NAC, một vùng kỵ nước nghiêm ngặt trong α -synuclein, là một peptit có chứa ít nhất 28 gốc axit amin (các gốc 60-87) và 35 gốc axit amin tùy ý (các gốc 61-95). NAC thể hiện xu hướng tạo cấu trúc gấp nếp beta (Iwai, et al., *Biochemistry*, 34 (1995) 10139-10145). Các trình tự axit amin của NAC này được mô tả trong Jensen và cộng sự, *Biochem. J.* 310 (1995), 91-94; số truy cập Ngân hàng gen S56746, Ueda và cộng sự, *PNAS USA* 90 (1993), 1282-11286.

Các α -synuclein không kết tụ hoặc mảnh của nó, kể cả NAC, có nghĩa là các đơn vị peptit đơn thể. Các α -synuclein không kết tụ hoặc các mảnh của nó là thường hòa tan và có khả năng tự kết tụ tạo thành dạng các oligo tan. Các oligo của α -synuclein và các mảnh của nó thường tan và tồn tại chủ yếu ở dạng chuỗi xoắn α . Các α -synuclein dạng đơn thể có thể được điều chế *in vitro* bằng cách hòa tan peptit lạnh khô trong DMSO nguyên chất trong điều kiện siêu âm. Dung dịch sau khi hòa tan được ly tâm để loại bỏ các tiểu phần không tan bất kỳ. α -synuclein kết tụ hoặc mảnh của nó, kể cả NAC, có nghĩa là các oligo của α -synuclein hoặc các mảnh của nó mà được kết hợp thành các kết cấu gấp nếp β không tan. α -synuclein kết tụ hoặc mảnh của nó, kể cả NAC, cũng mang nghĩa là các polyme dạng sợi. Các sợi này thường không tan. Một số kháng thể liên kết với α -synuclein hoặc mảnh hòa tan của nó hoặc α -synuclein hoặc mảnh kết tụ của nó. Một số kháng thể liên kết với các oligo của α -synuclein mạnh hơn nhiều so với các dạng đơn thể hoặc các dạng sợi. Một số kháng thể liên kết với cả α -synuclein hoặc mảnh của nó ở dạng hòa tan hoặc kết tụ, và tùy ý cũng liên kết với một số dạng oligo.

Các kháng thể kháng α -synuclein của người được bộc lộ theo sáng chế liên kết đặc hiệu với α -synuclein và các epitop của nó và các dạng hình dạng khác nhau của α -synuclein và các epitop của nó. Lấy ví dụ, được bộc lộ trong sáng chế là các kháng thể liên kết đặc hiệu với α -synuclein, α -synuclein ở dạng nguyên thủy đơn thể của nó, α -synuclein có chiều dài toàn vẹn hoặc bị cắt ngắn và α -synuclein kết tụ. Theo sáng chế, khi đề cập đến kháng thể mà "liên kết một cách đặc hiệu", "liên kết một cách chọn lọc", hoặc "liên kết ưu tiên" với α -synuclein đều chỉ kháng thể không liên kết với các protein không liên quan khác. Trong một ví dụ, kháng thể α -synuclein được bộc lộ

theo sáng chế có thể liên kết với α -synuclein hoặc với epitop của nó và không thể hiện liên kết khoảng trên 1,5 lần mức nền so với các protein khác. Một kháng thể mà "liên kết một cách đặc hiệu" hoặc "liên kết một cách chọn lọc" với α -synuclein chỉ kháng thể không liên kết với tất cả các dạng α -synuclein, nghĩa là, không liên kết với ít nhất một dạng α -synuclein thích hợp khác. Lấy ví dụ, được bộc lộ trong sáng chế là các kháng thể có thể phân biệt được giữa các dạng đơn thể và dạng kết tụ của α -synuclein, α -synuclein của người và chuột; α -synuclein có chiều dài toàn vẹn và dạng cắt ngắn cũng như α -synuclein của người so với dạng β và γ -synuclein. Do các kháng thể kháng α -synuclein của người theo sáng chế đã được phân lập từ nhóm các đối tượng cao tuổi không có dấu hiệu bị bệnh Parkinson và biểu hiện đáp ứng miễn dịch đặc hiệu α -synuclein, kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế cũng có thể được gọi là "kháng thể tự kháng của người" nhằm nhấn mạnh rằng các kháng thể này thực sự được biểu hiện bởi các đối tượng và không phải là dạng phân lập, lấy ví dụ, từ thư viện thực khuẩn thể biểu hiện globulin miễn dịch của người, mà cho đến nay nó thể hiện một phương pháp thông dụng để cố gắng tạo ra các kháng thể giống như các kháng thể của người.

Cần lưu ý rằng thuật ngữ "một" trước một đối tượng chỉ một hoặc nhiều đối tượng đó; lấy ví dụ, "một kháng thể" được hiểu là chỉ một hoặc nhiều kháng thể. Cũng như vậy, thuật ngữ "một", "một hoặc nhiều" và "ít nhất một" có thể được sử dụng thay thế cho nhau.

Theo sáng chế, thuật ngữ "polypeptit" dự định bao hàm cả số ít "polypeptit" cũng như cả số nhiều "các polypeptit" và chỉ phân tử được kết hợp từ các đơn thể (axit amin) liên kết một cách thẳng hàng với nhau bởi các liên kết amit (cũng được biết đến là liên kết peptit). Thuật ngữ "polypeptit" chỉ chuỗi hoặc nhiều chuỗi bất kỳ của hai hoặc nhiều axit amin, chứ không nhằm chỉ chiều dài cụ thể của sản phẩm đó. Vì vậy, các peptit, dipeptit, tripeptit, oligopeptit, "protein", "chuỗi axit amin" hoặc thuật ngữ bất kỳ khác được sử dụng chỉ một hoặc nhiều chuỗi của hai hoặc nhiều axit amin đều thuộc định nghĩa "polypeptit" và thuật ngữ "polypeptit" này có thể được sử dụng đại diện hoặc thay thế cho thuật ngữ bất kỳ trong số các thuật ngữ đó.

Thuật ngữ "polypeptit" cũng dự định dùng để chỉ các sản phẩm cải biến sau biểu hiện của polypeptit này, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn ở, các dẫn xuất glycosyl hóa, axetyl hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, dẫn xuất bởi các nhóm bảo vệ/phong bế,

thủy phân protein, hoặc các cải biến bởi các axit amin không xuất hiện trong tự nhiên. Một polypeptit có thể bắt nguồn từ nguồn sinh học tự nhiên hoặc được sản sinh bằng con đường tái tổ hợp, nhưng không nhất thiết phải được dịch mã từ trình tự axit nucleic thiết kế. Polypeptit này cũng có thể được sản sinh theo cách bất kỳ, kể cả bằng cách tổng hợp hóa học.

Polypeptit theo sáng chế cũng có thể có kích thước khoảng 3 axit amin hoặc hơn, 5 hoặc hơn, 10 hoặc hơn, 20 hoặc hơn, 25 hoặc hơn, 50 hoặc hơn, 75 hoặc hơn, 100 hoặc hơn, 200 hoặc hơn, 500 hoặc hơn, 1.000 hoặc hơn, hoặc 2.000 hoặc hơn. Các polypeptit này có thể có cấu trúc bậc ba xác định mặc dù chúng không nhất thiết phải có cấu trúc như vậy. Các polypeptit có cấu trúc bậc ba xác định chỉ các polypeptit được gấp nếp, và các polypeptit không có cấu trúc bậc ba xác định, đúng hơn là có thể có nhiều hình dạng khác nhau, chỉ các polypeptit không được gấp nếp. Như được sử dụng theo sáng chế, thuật ngữ glycoprotein chỉ một protein bắt cặp với ít nhất một gốc carbohydrat, được gắn vào protein thông qua chuỗi bên của một gốc axit amin chứa oxy hoặc nitơ, ví dụ, gốc serin hoặc gốc asparagin.

Polypeptit hoặc mảnh của nó, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được "phân lập" dự định là polypeptit không tồn tại trong môi trường tự nhiên. Không yêu cầu các mức độ tinh sạch cụ thể. Lấy ví dụ, một polypeptit được phân lập có thể được tách ra khỏi môi trường tự nhiên hoặc môi trường ban đầu của nó. Các polypeptit được sản xuất bằng cách tái tổ hợp được biểu hiện trong tế bào chủ được xem như là đã được phân lập theo mục đích của sáng chế, như là các polypeptit tái tổ hợp hoặc tự nhiên mà đã được phân tách, phân cắt hoặc về cơ bản hoặc một phần là được tinh sạch bởi các kỹ thuật thích hợp.

Cũng bao gồm các polypeptit theo sáng chế là các mảnh, các dẫn xuất, các dạng tương đồng, hoặc các biến thể của các polypeptit ở trên, và dạng kết hợp bất kỳ của chúng. Các thuật ngữ "mảnh", "biến thể", "dẫn xuất" và "dạng tương đồng" chỉ các polypeptit kháng thể hoặc các kháng thể theo sáng chế bao gồm các polypeptit bất kỳ còn ít nhất một số tính chất liên kết với kháng nguyên của phân tử, kháng thể hoặc polypeptit liên kết tương ứng ban đầu. Các mảnh polypeptit theo sáng chế bao gồm các mảnh thủy phân cũng như các đoạn cắt, ngoài các đoạn kháng thể đặc hiệu được đề cập theo sáng chế. Các biến thể của kháng thể polypeptit hoặc các kháng thể theo sáng chế bao gồm các mảnh như được đề cập ở trên, cũng như các polypeptit có các trình tự

axit amin biến đổi do thay thế, loại bỏ hoặc chèn thêm axit amin. Các biến thể cũng có thể xuất hiện trong tự nhiên hoặc là không xuất hiện trong tự nhiên. Các biến thể xuất hiện trong tự nhiên có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đột biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các polypeptit cải biến có thể bao gồm việc thay thế, loại bỏ hoặc bổ sung các axit amin bảo toàn hoặc không bảo toàn. Các dẫn xuất của các phân tử liên kết đặc hiệu với α -synuclein, ví dụ, các kháng thể polypeptit hoặc các kháng thể theo sáng chế, là các polypeptit đã được biến đổi, có biểu hiện các dấu hiệu bổ sung không có trong polypeptit ban đầu. Các ví dụ bao gồm các protein dung hợp. Các polypeptit cải biến theo sáng chế cũng có thể đề cập đến như là "các polypeptit tương đồng". Như được sử dụng theo sáng chế "dẫn xuất" của phân tử liên kết hoặc đoạn của nó, polypeptit kháng thể hoặc các kháng thể chỉ polypeptit mà có một hoặc nhiều gốc được dẫn xuất về mặt hóa học hoặc bằng cách phản ứng với nhóm chức năng phụ. Cũng bao hàm trong "dẫn xuất" là các polypeptit có chứa một hoặc nhiều dẫn xuất của hai mươi loại axit amin thiết yếu xuất hiện trong tự nhiên. Lấy ví dụ, 4-hydroxyprolin có thể được thế cho prolin; 5-hydroxylysin có thể được thế cho lysin; 3-methylhistidin có thể được thế cho histidin; homoserin có thể được thế cho serin; và ornithin có thể được thế cho lysin.

Thuật ngữ "polynucleotit" dự định bao hàm cả dạng số ít và số nhiều axit nucleic và chỉ phân tử hoặc cấu trúc axit nucleic được phân lập, ví dụ ARN thông tin (mARN) hoặc ADN plasmit (pDNA). Một polynucleotit có thể chứa một liên kết phosphodiester thông thường hoặc liên kết bất thường (ví dụ, liên kết amit, như đã được tìm thấy trong các peptit axit nucleic (PNA: peptide nucleic acid (PNA)). Thuật ngữ "axit nucleic" chỉ một hoặc nhiều đoạn axit nucleic, ví dụ, các đoạn ADN hoặc ARN, có trong polynucleotit đó. Các axit nucleic hoặc polynucleotit "được phân lập" chỉ phân tử axit nucleic, ADN hoặc ARN, mà chúng được phân tách khỏi môi trường nguyên thủy của nó. Lấy ví dụ, polynucleotit tái tổ hợp mã hóa kháng thể nằm trong một vectơ được coi là được phân lập theo mục đích của sáng chế. Các ví dụ khác về polynucleotit được phân lập bao gồm các polynucleotit tái tổ hợp trong các tế bào chủ khác loại hoặc các polynucleotit được tinh sạch (một phần hoặc về cơ bản) trong dung dịch. Các phân tử ARN được phân lập bao gồm cả các bản phiên mã ARN của polynucleotit *in vivo* hoặc *in vitro* theo sáng chế. Các polynucleotit hoặc axit nucleic được phân lập theo sáng chế còn bao gồm cả các phân tử được tổng hợp nhân tạo. Ngoài ra, polynucleotit hoặc axit

nucleic có thể là hoặc có thể chứa một thành phần điều hòa như là trình tự khởi đầu phiên mã, vị trí liên kết với ribosom hoặc điểm kết thúc phiên mã.

Theo sáng chế, một "vùng mã hóa" là một phần của axit nucleic chứa các bộ ba dịch mã thành axit amin. Mặc dù một "bộ ba kết thúc phiên mã" (TAG, TGA, hoặc TAA) không được dịch mã thành axit amin vẫn được coi là một phần của vùng mã hóa, nhưng các trình tự hai bên, lấy ví dụ các trình tự khởi đầu phiên mã, vị trí liên kết với ribosom, vùng kết thúc phiên mã, các intron, và các thành phần tương tự sẽ không được coi là một phần của vùng mã hóa. Hai hoặc nhiều vùng mã hóa theo sáng chế có thể có mặt trong cấu trúc polynucleotit đơn lẻ, ví dụ, trong một vector đơn lẻ, hoặc trong các cấu trúc polynucleotit độc lập, ví dụ, các vector độc lập (khác nhau). Hơn thế nữa, vector bất kỳ có thể chứa một vùng mã hóa đơn, hoặc chứa hai hoặc nhiều vùng mã hóa, ví dụ, một vector riêng lẻ có thể mã hóa một cách độc lập một vùng biến đổi của chuỗi nặng và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Ngoài ra, các vector, polynucleotit, hoặc axit nucleic theo sáng chế có thể mã hóa cho các vùng mã hóa ngoại lai, hoặc là dung hợp hoặc là không dung hợp với axit nucleic mã hóa phân tử liên kết, kháng thể, hoặc mảnh kháng thể, biến thể, hoặc dẫn xuất của biến thể đó. Các vùng mã hóa ngoại lai bao gồm không hạn chế các thành phần biệt hóa hoặc các motif, như là các peptit tín hiệu tiết hoặc một vùng chức năng khác.

Trong các phương án cụ thể, polynucleotit hoặc axit nucleic này là ADN. Trong trường hợp là ADN, polynucleotit mà chứa axit nucleic mã hóa một polypeptit thông thường có thể bao gồm một trình tự khởi đầu phiên mã và/hoặc các thành phần điều khiển phiên mã hoặc dịch mã kết hợp một cách có kiểm soát với một hoặc nhiều vùng mã hóa. Việc kết hợp một cách có kiểm soát là khi vùng mã hóa cho sản phẩm của gen, ví dụ, polypeptit, được kết hợp với một hoặc nhiều trình tự điều hòa theo cách đặt biểu hiện của sản phẩm gen dưới tác dụng hoặc điều khiển của (các) trình tự điều hòa đó. Hai đoạn ADN (như là một vùng mã hóa polypeptit và trình tự khởi đầu phiên mã với nó) là "được kết hợp một cách có kiểm soát" hoặc "được liên kết một cách có kiểm soát" nếu việc cảm ứng chức năng trình tự khởi đầu phiên mã gây ra việc phiên mã mARN mã hóa cho sản phẩm gen mong muốn và nếu bản chất của mối liên kết giữa hai đoạn ADN đó không ảnh hưởng đến khả năng của trình tự điều hòa biểu hiện để dẫn đến sự biểu hiện của sản phẩm gen đó hoặc ảnh hưởng đến khả năng của ADN khuôn được phiên mã. Vì vậy, vùng trình tự khởi đầu phiên mã có thể được liên kết

một cách có kiểm soát với axit nucleic mã hóa polypeptit nếu trình tự khởi đầu phiên mã đó có khả năng ảnh hưởng đến việc phiên mã của axit nucleic này. Trình tự khởi đầu phiên mã này có thể là trình tự khởi đầu phiên mã đặc hiệu tế bào, chỉ trực tiếp phiên mã chủ yếu ADN trong tế bào tiền định. Các thành phần điều khiển phiên mã khác, bên cạnh trình tự khởi đầu phiên mã, lấy ví dụ trình tự tăng cường, trình tự kiểm soát tiêu cực, trình tự kìm hãm, và tín hiệu kết thúc phiên mã, có thể được liên kết một cách có kiểm soát với polynucleotit để trực tiếp được phiên mã trong tế bào cụ thể. Các trình tự khởi đầu phiên mã và các vùng điều khiển phiên mã thích hợp cũng được bộc lộ theo sáng chế.

Có nhiều vùng điều khiển phiên mã là đã biết đối với người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các vùng điều khiển này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các vùng điều khiển phiên mã có chức năng trong các tế bào động vật có xương sống, như là, nhưng không giới hạn ở, các trình tự khởi đầu phiên mã và trình tự tăng cường của các cytomegalovirut (trình tự khởi đầu phiên mã sớm trực tiếp, khi tiếp hợp với intron-A), virut 40 của khỉ (trình tự khởi đầu phiên mã sớm), và các retrovirut (như là virut broun thịt Rous). Các vùng điều khiển phiên mã khác bao gồm các vùng điều khiển phiên mã có nguồn gốc từ gen động vật có xương sống như là actin, protein sốc nhiệt, hormon sinh trưởng của bò và β -globin của thỏ, cũng như các trình tự khác có khả năng điều khiển biểu hiện gen trong tế bào nhân thực. Các vùng điều khiển phiên mã thích hợp khác bao gồm các trình tự khởi đầu phiên mã và trình tự tăng cường đặc hiệu mô cũng như các trình tự khởi đầu phiên mã có thể cảm ứng bởi lymphokin (ví dụ, các trình tự khởi đầu phiên mã có thể được cảm ứng bởi các interferon hoặc các interleukin).

Tương tự, có nhiều trình tự điều khiển dịch mã đã biết đối với những người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các trình tự điều khiển này bao gồm, nhưng không hạn chế ở, các vị trí liên kết với ribosom, các bộ ba mã hóa khởi đầu và kết thúc dịch mã, và các thành phần có nguồn gốc từ picoARNvirut (vị trí bám nội sinh ribosom, hoặc IRES, cũng được đề cập đến như là trình tự CITE).

Theo các phương án khác, polynucleotit theo sáng chế là ARN, lấy ví dụ, ở dạng ARN thông tin (mARN).

Các vùng mã hóa polynucleotit và các vùng mã hóa axit nucleic theo sáng chế có thể liên quan đến các vùng mã hóa bổ sung mà vùng này mã hóa cho peptit tín hiệu

hoặc peptit kích thích tiết, chỉ định tiết polypeptit được mã hóa bởi polynucleotit theo sáng chế. Theo giả thuyết peptit tín hiệu, các protein được tiết ra bởi các tế bào động vật có vú có tín hiệu peptit hoặc trình tự dẫn tiết mà trình tự này được tách ra khỏi protein trưởng thành một khi được xuất ra khỏi chuỗi protein đang tổng hợp qua mạng lưới nội chất nhám được bắt đầu. Người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này nhận thức được rằng các polypeptit được tiết ra từ các tế bào động vật có xương sống nói chung có peptit tín hiệu dung hợp với đầu N của polypeptit đó, mà tín hiệu này sẽ tách ra khỏi polypeptit hoàn chỉnh hoặc "có chiều dài đầy đủ" để tạo ra dạng được tiết ra hoặc dạng "trưởng thành" của polypeptit đó. Trong các phương án cụ thể, peptit tín hiệu nguyên thủy này, ví dụ, peptit tín hiệu của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch này được sử dụng, hoặc dẫn xuất chức năng của trình tự đó, có khả năng trực tiếp tiết ra polypeptit mà chúng có liên kết một cách có kiểm soát với polypeptit này. Mặt khác, peptit tín hiệu của động vật có vú khác loài, hoặc dẫn xuất chức năng của nó, có thể được sử dụng. Lấy ví dụ, trình tự dẫn kiểu đại có thể được thay thế bằng trình tự dẫn hoạt hóa plasminogen ở mô của người (TPA) hoặc β -glucuronidaza của chuột.

Trừ khi được nêu với nghĩa khác, các thuật ngữ "rối loạn" và "bệnh" theo sáng chế được sử dụng thay thế cho nhau.

Một "phân tử liên kết" như được sử dụng trong ngữ cảnh theo sáng chế về cơ bản liên quan đến các kháng thể, và các mảnh của nó, nhưng cũng đề cập đến các phân tử không phải là kháng thể mà có liên kết với α -synuclein bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các hormon, thụ thể, phối tử, các phân tử của phức hệ phù hợp mô chủ yếu (MHC: major histocompatibility complex), các protein ngăn cản sự cuộn gấp sai của protein hoặc tạo điều kiện thuận lợi cho protein cuộn gấp đúng như là protein sốc nhiệt (HSP: heat shock protein) cũng như các phân tử dính bám tế bào như các thành viên của cadherin, integrin, lectin typ C và siêu họ globulin miễn dịch (Ig). Vì vậy, với mục đích nhằm làm rõ mà không làm hạn chế phạm vi của sáng chế, phần lớn các phương án sau đây được tập trung vào các kháng thể và các phân tử tương tự kháng thể có biểu hiện các phân tử liên kết ưu tiên để phát triển các tác nhân dùng trong chẩn đoán và điều trị bệnh.

Thuật ngữ "kháng thể" và "globulin miễn dịch" theo sáng chế được sử dụng thay thế cho nhau. Kháng thể hoặc globulin miễn dịch là một phân tử liên kết với α -

synuclein mà có chứa ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi nặng, và thông thường chứa ít nhất các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Cấu trúc cơ sở của globulin miễn dịch trong hệ động vật có xương sống đã được biết rõ; ví dụ, xem: Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. 1988).

Như được mô tả chi tiết chi tiết dưới đây, thuật ngữ "globulin miễn dịch" bao gồm nhiều lớp polypeptit lớn mà có thể nhận biết được về mặt hóa sinh. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá được là các chuỗi nặng được phân loại như gama, mu, alpha, delta, hoặc epsilon, (γ , μ , α , δ , ϵ) với một số phân lớp trong số đó (ví dụ, $\gamma 1$ - $\gamma 4$). Bản chất của chuỗi này có thể xác định theo "lớp" kháng thể như là IgG, IgM, IgA, hoặc IgE, một cách tương ứng. Các phân lớp globulin miễn dịch (các lớp) ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, v.v. là đã biết và được xác định cụ thể khi xem xét chuyên hóa về mặt chức năng. Các phiên bản cải biến của từng loại này và các lớp của chúng là nhận biết dễ dàng đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật với những bậc cụ thể theo sáng chế và, vì vậy, chúng thuộc phạm vi của sáng chế. Tất cả các lớp globulin miễn dịch rõ ràng nằm trong phạm vi của sáng chế, các mô tả sau đây nói chung đề cập trực tiếp đến lớp IgG của các phân tử globulin miễn dịch. Liên quan đến IgG, một phân tử globulin miễn dịch chuẩn bao gồm hai polypeptit chuỗi nhẹ giống nhau có khối lượng phân tử khoảng 23.000 Dalton, và hai polypeptit chuỗi nặng giống nhau có khối lượng phân tử khoảng 53.000-70.000 Dalton. Bốn chuỗi này thường gắn kết với nhau bằng liên kết disulfit tạo thành hình dạng chữ "Y", trong đó hai chuỗi nhẹ đỡ hai chuỗi nặng từ cửa của chữ "Y" và tiếp tục cho đến vùng biến đổi.

Các chuỗi nhẹ được phân chia thành kapa hoặc lambda (κ , λ). Mỗi lớp chuỗi nặng có thể được liên kết với hoặc là chuỗi nhẹ kapa hoặc là chuỗi nhẹ lambda. Nói chung, các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được liên kết đồng hóa trị với nhau, và các phần "đuôi" của hai chuỗi nặng này được liên kết với nhau bằng liên kết đồng hóa trị disulfit hoặc liên kết phi đồng hóa trị khi các globulin miễn dịch này được sinh ra hoặc là từ tế bào lai, tế bào B hoặc là từ các tế bào chủ được thao tác di truyền. Trong chuỗi nặng, trình tự axit amin đi từ đầu N tại đầu chạc của hình dạng chữ Y đến đầu C cuối cùng của chuỗi.

Cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được chia thành hai vùng tương ứng về cấu trúc và chức năng. Thuật ngữ "hằng định" và "biến đổi" được sử dụng về mặt chức năng. Theo khía cạnh này, có thể dự đoán được các vùng biến đổi của hai phần chuỗi nhẹ (V_L) và chuỗi nặng (V_H) xác định sự nhận dạng và tính đặc hiệu với kháng nguyên. Ngược lại, vùng hằng định của chuỗi nhẹ (CL) và chuỗi nặng ($CH1$, $CH2$ hoặc $CH3$) chỉ các tính chất sinh học quan trọng như là sự tiết, khả năng chuyển động qua nhau thai, liên kết với thụ thể Fc , liên kết bổ trợ, và tương tự. Theo cách thông thường, số của vùng hằng định được đánh tăng lên khi chúng xa dần vị trí liên kết với kháng nguyên hoặc đầu amin của kháng thể đó. Phần đầu N là vùng biến đổi và vùng đầu C là vùng hằng định; vùng $CH3$ và vùng CL trên thực tế bao gồm cả đầu carboxy của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ một cách tương ứng.

Như được mô tả ở trên, vùng biến đổi cho phép kháng thể nhận biết chọn lọc và liên kết một cách đặc hiệu với các epitop trên các kháng nguyên. Đó là, vùng V_L và vùng V_H , hoặc tập hợp con của vùng xác định tính bổ trợ (CDR: complementarity determining region), của kháng thể kết hợp tạo vùng biến đổi mà xác định như cấu trúc bậc ba của vị trí liên kết kháng nguyên. Các dạng kháng thể cấu trúc bậc bốn tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên xuất hiện tại đầu mỗi nhánh chữ Y. Cụ thể hơn, vị trí liên kết với kháng nguyên được xác định bởi ba CDR trên mỗi chuỗi V_H và V_L . Các đoạn kháng thể hoặc globulin miễn dịch bất kỳ có chứa cấu trúc đủ khả năng liên kết đặc hiệu với α -synuclein theo sáng chế dùng thay thế cho "mảnh liên kết" hoặc "mảnh đặc hiệu miễn dịch".

Trong các kháng thể xuất hiện trong tự nhiên, kháng thể bao gồm sáu vùng siêu biến, đôi khi được gọi là "vùng biến đổi" hoặc "CDR" có mặt trong mỗi vùng liên kết với kháng nguyên, vùng này có trình tự axit amin ngắn không liên tục mà có vị trí đặc hiệu để tạo thành vùng liên kết với kháng nguyên do kháng thể có cấu trúc bậc ba của nó trong môi trường nước. Các "CDR" được gắn sườn với bốn vùng "khung" hoặc các "FR" tương đối bảo toàn mà vùng này thể hiện tính biến đổi nội phân tử thấp. Các vùng khung này tiếp nhận phần lớn dạng gấp nếp β và các CDR tạo thành các cấu trúc vòng mà cấu trúc này gắn với, trong một số trường hợp, tạo ra phần cấu trúc gấp nếp β . Vì vậy, các vùng khung hoạt động tạo thành dạng giàn khung cho phép các CDR định hướng chính xác bởi các tương tác nội chuỗi, các tương tác liên kết phi đồng hóa trị. Vùng liên kết với kháng nguyên được tạo thành bởi các CDR tại vị trí xác định trên

bề mặt hỗ trợ với epitop trong kháng nguyên phản ứng miễn dịch. Bề mặt hỗ trợ này thúc đẩy liên kết phi đồng hóa trị của kháng thể đó với các epitop có cùng nguồn gốc của nó. Các axit amin trong các CDR và vùng khung hoạt động, một cách tương ứng, có thể được xác định một cách dễ dàng đối với vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ cụ thể bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, do chúng đã được xác định một cách chính xác; xem: "Sequences of Proteins of Immunological Interest," Kabat, E., et al., U.S. Department of Health and Human Services, (1983); và Chothia and Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung của chúng.

Trong trường hợp mà sử dụng hai hoặc nhiều thuật ngữ được sử dụng và/hoặc được chấp nhận trong lĩnh vực kỹ thuật này, các thuật ngữ được định nghĩa theo sáng chế dự định bao hàm tất cả các nghĩa trừ khi được nêu với nghĩa trái ngược. Lấy ví dụ cụ thể là việc sử dụng thuật ngữ "vùng xác định tính hỗ trợ" ("CDR") được mô tả là các vị trí kết hợp với kháng nguyên không tiếp giáp được tìm thấy trong vùng biến đổi của cả hai polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vùng cụ thể này đã được mô tả bởi Kabat và cộng sự, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) và bởi Chothia và Lesk, J. Mol. Biol., 196 (1987), 901-917, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, trong đó bao gồm việc xác định các gốc axit amin trùng lặp hoặc là các tập hợp con của các gốc axit amin đó khi so sánh với từng vùng khác. Tuy nhiên, áp dụng định nghĩa khác để chỉ CDR của kháng thể hoặc các biến thể của nó được dự định nằm trong phạm vi của thuật ngữ này như được định nghĩa và sử dụng theo sáng chế. Các gốc axit amin phù hợp bao quanh CDR như được định nghĩa bởi mỗi tài liệu trong số các tài liệu được viện dẫn ở trên được nêu trong Bảng 1 để so sánh. Số lượng xác định của các gốc quanh một CDR cụ thể là rất khác nhau phụ thuộc vào trình tự và kích thước của CDR đó. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định theo cách thông dụng xem đâu là gốc có chứa một vùng siêu biến xác định hoặc CDR của IgG kiểu phụ của người của kháng thể mà đưa ra trình tự axit amin của vùng biến đổi của kháng thể đó.

Bảng 1: Các CDR xác định¹

	Kabat	Chothia
VH CDR1	31-35	26-32
VH CDR2	50-65	52-58
VH CDR3	95-102	95-102
VL CDR1	24-34	26-32
VL CDR2	50-56	50-52
VL CDR3	89-97	91-96

¹Việc đánh số tất cả các CDR được xác định trong Bảng 1 là theo cách đánh số thông thường được đưa ra bởi Kabat và cộng sự (xem bên dưới).

Kabat và cộng sự cũng xác định hệ thống đánh số đối với trình tự vùng biến đổi mà hệ thống này có thể áp dụng cho kháng thể bất kỳ. Một người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể gán được hệ thống "đánh số Kabat" cho trình tự vùng biến đổi bất kỳ, mà không cần tham khảo dữ liệu thực nghiệm bất kỳ ngoài phạm vi của chính trình tự đó. Theo sáng chế, "đánh số Kabat" chỉ hệ thống đánh số được đưa ra bởi Kabat và cộng sự, U.S. Dept. of Health and Human Services, "Sequence of Proteins of Immunological Interest" (1983). Trừ khi được nêu với nghĩa khác, việc viện dẫn đánh số của các phần gốc axit amin cụ thể trong kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế là theo hệ thống đánh số Kabat này.

Các kháng thể hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các đoạn đặc hiệu miễn dịch, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế bao gồm, nhưng không hạn chế ở, các kháng thể đa dòng, đơn dòng, đa đặc hiệu, kháng thể của người, kháng thể được làm tương thích với người, kháng thể được làm tương thích với động vật linh trưởng, kháng thể được làm tương thích với chuột hoặc kháng thể khảm, kháng thể chuỗi đơn, mảnh liên kết với epitop, ví dụ, Fab, Fab' và F(ab')₂, Fd, Fvs, Fvs chuỗi đơn (scFv: single chain Fvs), các kháng thể chuỗi đơn, Fvs được liên kết disulfit (sdFv), các mảnh chứa vùng V_L hoặc vùng V_H, các mảnh được tạo ra bởi thư viện biểu hiện Fab, và kháng thể kháng idiotypic (kháng Id) (bao gồm, ví dụ, các kháng thể kháng Id đối với các kháng thể được mô tả theo sáng chế). Các phân tử ScFv là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này đã được mô tả, ví dụ trong US 5.892.019. Các phân tử globulin

miễn dịch hoặc kháng thể theo sáng chế có thể là typ bất kỳ (ví dụ, IgG, IgE, IgM, IgD, IgA, và IgY), lớp bất kỳ (ví dụ, IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1 và IgA2) hoặc phân lớp bất kỳ của phân tử globulin miễn dịch.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế không phải là IgM hoặc dẫn xuất của nó với cấu trúc hóa trị năm. Cụ thể là, các ứng dụng cụ thể theo sáng chế, đặc biệt là sử dụng trong điều trị bệnh, các IgM ít hữu dụng như IgG và các kháng thể hóa trị hai khác hoặc các phân tử liên kết tương ứng do các IgM này phụ thuộc vào cấu trúc hóa trị năm của chúng và thiếu thuận thực ái lực thường thể hiện các hoạt tính phản ứng chéo không đặc hiệu và ái lực rất thấp.

Trong một phương án ưu tiên cụ thể, kháng thể theo sáng chế không phải là kháng thể đa dòng, nghĩa là về cơ bản nó bao gồm một dạng kháng thể cụ thể chứ không phải là phức hợp thu được từ mẫu globulin huyết thanh miễn dịch.

Các mảnh kháng thể, bao gồm các kháng thể chuỗi đơn, có thể chứa (các) vùng biến đổi riêng lẻ hoặc ở dạng kết hợp với toàn bộ hoặc một phần các vùng sau: vùng bản lề, các vùng CH1, CH2, và CH3. Sáng chế cũng bao gồm các mảnh liên kết với α -synuclein chứa phức hợp bất kỳ của (các) vùng biến đổi với vùng bản lề, các vùng CH1, CH2, và CH3. Các kháng thể hoặc các đoạn đặc hiệu miễn dịch của chúng theo sáng chế có thể có nguồn gốc từ động vật bất kỳ bao gồm chim và động vật có vú. Tốt hơn là, kháng thể đó là kháng thể của người, chuột, lừa, thỏ, dê, chuột lang, lạc đà, lạc đà không bướu, ngựa hoặc kháng thể của gà. Trong một phương án khác, vùng biến đổi này có thể là condricthoid nguyên thủy (ví dụ, từ cá mập).

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể đơn dòng của người được phân lập từ người. Một cách tùy ý, vùng khung hoạt động của kháng thể này của người được so sánh và lựa chọn phù hợp với các trình tự vùng biến đổi của dòng tế bào gốc thích hợp của người trong cơ sở dữ liệu; ví dụ, xem: Vbase (<http://vbase.mrc-cpe.cam.ac.uk/>) đặt máy chủ tại Trung tâm kỹ thuật Protein MCPE (MCPE: MRC Centre for Protein Engineering) (Cambridge, UK). Lấy ví dụ, axit amin được xem như là có khả năng không trùng với trình tự dòng tế bào gốc thích hợp có thể là do trình tự đoạn môi PCR được kết hợp trong quá trình nhân dòng. Việc so sánh với các kháng thể nhân tạo tương tự của người như là các đoạn kháng thể chuỗi đơn (scFvs) từ thư viện kháng thể biểu hiện thực thể khuẩn hoặc chuột chuyển gen kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế đặc trưng bởi (i) thu được bằng cách sử dụng đáp ứng miễn

dịch trên người hơn là động vật thay thế, nghĩa là, kháng thể này có thể được sản sinh ra trong đáp ứng với α -synuclein tự nhiên với hình dạng thích hợp của chúng trong cơ thể người, (ii) có thể bảo vệ được cá thể hoặc ít nhất là bảo vệ đáng kể trước sự xuất hiện của α -synuclein, và (iii) nếu kháng thể là bắt nguồn từ người thì các nguy cơ phản ứng chéo với chính kháng nguyên đó là tối thiểu hóa. Vì vậy, theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng của người", "kháng thể tự kháng đơn dòng của người", "kháng thể của người" và các thuật ngữ tương tự được sử dụng chỉ phân tử liên kết với α -synuclein mà có nguồn gốc từ người, nghĩa là, kháng thể này đã được phân lập từ tế bào của người như là tế bào B hoặc tế bào lai của nó hoặc cADN của nó mà đã được nhân dòng trực tiếp từ mARN trong tế bào của người, lấy ví dụ, tế bào B nhớ của người. Kháng thể của người vẫn là "người" ngay cả khi việc thể axit amin đã được thực hiện trong kháng thể đó, ví dụ, để tăng cường tính chất liên kết.

Các kháng thể có nguồn gốc từ các thư viện globulin miễn dịch của người hoặc động vật chuyển gen đối với một hoặc nhiều globulin miễn dịch của người không biểu hiện các globulin miễn dịch nội sinh, như được mô tả dưới đây và, lấy ví dụ, trong US 5.939.598 bởi Kucherlapati và cộng sự, đã đề cập kháng thể giống kháng thể của người với mục đích phân biệt chúng với kháng thể thực của người theo sáng chế.

Theo sáng chế, thuật ngữ "kháng thể được làm tương thích với chuột" hoặc "globulin miễn dịch được làm tương thích với chuột" chỉ kháng thể chứa một hoặc nhiều CDR từ kháng thể của người theo sáng chế; và vùng khung hoạt động kháng thể của người có chứa các axit amin thay thế và/hoặc loại bỏ và/hoặc chèn thêm dựa trên trình tự kháng thể của chuột. Globulin miễn dịch này của người cung cấp các CDR được gọi là "gốc" hoặc "phần tiếp nhận" và kháng thể của chuột cung cấp các thay đổi trong vùng khung hoạt động được gọi là "thể cho". Các vùng hằng định không cần xuất hiện, nhưng nếu chúng xuất hiện thì về cơ bản chúng thường tương đồng với vùng hằng định trong kháng thể của chuột, nghĩa là có độ tương đồng về trình tự ít nhất khoảng 85- 90%, tốt hơn là khoảng 95% hoặc hơn. Do đó, theo một số phương án, globulin miễn dịch chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của người được làm tương thích với chuột có chứa vùng hằng định của chuột, các CDR của người, và vùng khung hoạt động về cơ bản là của người có một số gốc thể axit amin "tương thích với chuột". Thông thường, một "kháng thể được làm tương thích với chuột" là một kháng thể có chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ được làm tương thích với chuột và/hoặc vùng biến đổi

chuỗi nặng được làm tương thích với chuột. Lấy ví dụ, kháng thể được làm tương thích với chuột không bao hàm kháng thể khảm thông thường, ví dụ, do toàn bộ vùng biến đổi của kháng thể khảm là không phải của chuột. Một kháng thể cải biến mà đã được "làm tương thích với chuột" bởi các quá trình "mô phỏng theo chuột" liên kết với cùng loại kháng nguyên như kháng thể gốc cung cấp các CDR và thường ít gây miễn dịch trong chuột, như khi so sánh với kháng thể gốc.

Theo sáng chế, thuật ngữ "phần chuỗi nặng" bao gồm các trình tự axit amin có nguồn gốc từ chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Một polypeptit chứa một phần chuỗi nặng của ít nhất một: vùng CH1, vùng bản lề (nghĩa là, phía trên, phần giữa, và/hoặc vùng bản lề thấp hơn), vùng CH2, vùng CH3, hoặc biến thể hoặc đoạn của nó. Lấy ví dụ, một polypeptit liên kết để sử dụng theo sáng chế có thể chứa chuỗi polypeptit bao gồm vùng CH1; một chuỗi polypeptit chứa vùng CH1, ít nhất một phần của vùng bản lề, và vùng CH2; chuỗi polypeptit chứa vùng CH1 và vùng CH3; một chuỗi polypeptit chứa vùng CH1, ít nhất một phần của vùng bản lề, và vùng CH3, hoặc một chuỗi polypeptit chứa vùng CH1, ít nhất một phần của vùng bản lề, vùng CH2, và vùng CH3. Theo một phương án khác, polypeptit theo sáng chế bao gồm một chuỗi polypeptit chứa vùng CH3. Hơn nữa, polypeptit liên kết được sử dụng trong sáng chế có thể thiếu ít nhất một phần vùng CH2 (ví dụ, toàn bộ hoặc một phần vùng CH2). Như đã đề cập ở trên, sẽ được hiểu bởi một người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này là các vùng này (ví dụ, các phần chuỗi nặng) có thể được cải biến sao cho chúng khác nhau về trình tự axit amin từ phân tử globulin miễn dịch xuất hiện trong tự nhiên.

Trong các kháng thể cụ thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của chúng được mô tả theo sáng chế, các phần chuỗi nặng của một chuỗi polypeptit của dạng đa thể là giống hệt với phần tương ứng của chúng trong chuỗi polypeptit thứ hai của dạng đa thể đó. Hay nói cách khác, các đơn thể chứa các phần chuỗi nặng theo sáng chế là không giống hệt nhau. Lấy ví dụ, mỗi đơn thể có thể bao gồm vị trí liên kết đích khác nhau, tạo thành, lấy ví dụ, kháng thể đặc hiệu đôi hoặc là Fvs chuỗi đơn tạo dime. Theo một phương án khác, các kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được mô tả theo sáng chế bao gồm một chuỗi polypeptit đơn như là scFvs và được biểu hiện nội bào (trong cơ thể) có khả năng ứng dụng trong chẩn đoán và điều trị bệnh *in vivo*.

Các phân chuỗi nặng của polypeptit liên kết để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán và điều trị theo sáng chế có thể thu được từ các phân tử globulin miễn dịch khác nhau. Lấy ví dụ, phân chuỗi nặng của một polypeptit có thể chứa vùng CH1 có nguồn gốc từ phân tử IgG1 và vùng bản lề có nguồn gốc từ phân tử IgG3. Trong một ví dụ khác, phân chuỗi nặng có thể chứa một vùng bản lề có nguồn gốc, một phần, từ phân tử IgG1 và, một phần, từ phân tử IgG3. Trong một ví dụ khác, phân chuỗi nặng có thể chứa một bản lề khảm có nguồn gốc, một phần, từ phân tử IgG1 và, một phần, từ phân tử IgG4.

Theo sáng chế, thuật ngữ "phân chuỗi nhẹ" bao gồm các trình tự axit amin có nguồn gốc từ chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch. Tốt hơn là, phân chuỗi nhẹ này chứa ít nhất một vùng V_L hoặc C_L.

Kích thước tối thiểu của các epitop peptit hoặc polypeptit đối với một kháng thể được cho là khoảng bốn đến năm axit amin. Các epitop peptit hoặc polypeptit tốt hơn là có chứa ít nhất bảy, tốt hơn nữa chứa ít nhất chín và tốt nhất là trong khoảng ít nhất từ 15 đến 30 axit amin. Do một CDR có thể nhận biết với một peptit hoặc polypeptit kháng nguyên ở dạng cấu trúc bậc ba của nó, thì axit amin bao gồm trong epitop không nhất thiết liên kề, và trong một số trường hợp, thậm chí không phải là cùng trên chuỗi peptit đó. Theo sáng chế, epitop peptit hoặc polypeptit được nhận biết bởi các kháng thể theo sáng chế có chứa một trình tự ít nhất 4, ít nhất 5, ít nhất 6, ít nhất 7, tốt hơn là ít nhất 8, ít nhất 9, ít nhất 10, ít nhất 15, ít nhất 20, ít nhất 25, hoặc trong khoảng từ 15 đến 30 axit amin liên kề hoặc không liên kề của α -synuclein.

Theo như "liên kết một cách đặc hiệu", hoặc "nhận dạng một cách đặc hiệu", được sử dụng thay thế cho nhau theo sáng chế, mang nghĩa chung là phân tử liên kết, ví dụ, một kháng thể liên kết với một epitop thông qua vùng liên kết kháng nguyên của nó, và việc liên kết đó dẫn đến một số bắt cặp giữa vùng liên kết kháng nguyên đó với một epitop. Theo định nghĩa này, một kháng thể khi nói nó "liên kết một cách đặc hiệu" với một epitop là nó liên kết với epitop đó thông qua vùng liên kết với kháng nguyên của nó dễ dàng hơn khi liên kết với epitop ngẫu nhiên không liên quan. Thuật ngữ "tính đặc hiệu" được sử dụng theo sáng chế để định tính ái lực liên quan mà theo đó kháng thể cụ thể đó liên kết với một epitop cụ thể. Lấy ví dụ, kháng thể "A" có thể được xem như là có tính đặc hiệu cao hơn đối với một epitop cụ thể so với kháng thể

"B," hoặc kháng thể "A" có thể được nói là liên kết với epitop "C" với tính đặc hiệu cao hơn so với nó liên kết với epitop "D" liên quan.

Khi nêu, thuật ngữ "đặc tính liên kết miễn dịch" hoặc các tính chất liên kết khác của kháng thể này với một kháng nguyên, trong tất cả dạng chuẩn của nó, chỉ tính đặc hiệu, ái tính, tính phản ứng chéo, và các đặc tính liên kết khác của kháng thể đó.

Bằng cách "liên kết một cách ưu tiên", có nghĩa là phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể liên kết một cách đặc hiệu với một epitop dễ dàng hơn nó liên kết với epitop liên quan, tương tự, tương đồng, hoặc giống nhau. Do đó, một kháng thể mà "liên kết ưu tiên" với một epitop cụ thể có thể liên kết dễ dàng hơn với epitop đó so với epitop liên quan, ngay cả khi kháng thể đó có thể phản ứng chéo với epitop liên quan đó.

Ví dụ không hạn chế về phân tử liên kết, ví dụ, một kháng thể có thể được xem như là liên kết với epitop thứ nhất dễ dàng hơn nếu nó liên kết với epitop đó với hằng số phân ly (K_D) thấp hơn K_D của kháng thể đó đối với epitop thứ hai. Theo một ví dụ không hạn chế, một kháng thể có thể được xem là liên kết với kháng nguyên thứ nhất dễ dàng hơn nếu nó liên kết với epitop thứ nhất với một ái lực mà ái lực đó có mức sắp xếp về cường độ K_D thấp hơn ít nhất một mức đối với epitop thứ hai. Một ví dụ không hạn chế khác, một kháng thể có thể được coi như là liên kết với epitop thứ nhất dễ dàng hơn nếu nó liên kết với epitop thứ nhất đó với một ái lực mà có mức sắp xếp về cường độ K_D thấp hơn ít nhất hai mức đối với kháng thể thứ hai.

Trong một ví dụ không hạn chế khác, một phân tử liên kết, ví dụ, một kháng thể có thể được xem là liên kết một cách dễ dàng hơn với epitop thứ nhất nếu nó liên kết với epitop thứ nhất đó với tỷ lệ off ($k(\text{off})$) thấp hơn $k(\text{off})$ của kháng thể đó đối với epitop thứ hai. Trong một ví dụ không hạn chế khác, một kháng thể có thể được coi là liên kết với epitop thứ nhất dễ dàng hơn nếu nó liên kết với epitop thứ nhất đó với ái lực mà có mức sắp xếp về cường độ thấp hơn $k(\text{off})$ của kháng thể đó ít nhất một bậc khi so với epitop thứ hai. Trong một ví dụ không hạn chế khác, một kháng thể có thể được xem là liên kết với epitop thứ nhất dễ dàng hơn nếu nó liên kết với epitop thứ nhất đó với một ái lực mà có mức sắp xếp về cường độ thấp hơn $k(\text{off})$ của kháng thể đó ít nhất hai bậc so với epitop thứ hai.

Một phân tử liên kết, ví dụ, một kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất được mô tả theo sáng chế có thể nói là được liên kết với α -synuclein hoặc một mảnh hoặc biến thể của nó với một tỷ lệ ($k(\text{off})$) thấp hơn hoặc

bằng 5×10^{-2} /giây, 10^{-2} /giây, 5×10^{-3} /giây hoặc 10^{-3} /giây. Tốt hơn là, một kháng thể theo sáng chế có thể nói là liên kết với α -synuclein hoặc mảnh hoặc biến thể của nó với tỷ lệ (k(off)) thấp hơn hoặc bằng 5×10^{-4} /giây, 10^{-4} /giây, 5×10^{-5} /giây, hoặc 10^{-5} /giây 5×10^{-6} /giây, 10^{-6} /giây, 5×10^{-7} /giây hoặc 10^{-7} /giây.

Một phân tử liên kết, ví dụ, một kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất được mô tả theo sáng chế có thể được nói là liên kết với α -synuclein hoặc mảnh hoặc biến thể của nó với tỷ lệ (k(on)) lớn hơn hoặc bằng 10^3 M⁻¹/giây, 5×10^3 M⁻¹/giây, 10^4 M⁻¹/giây hoặc 5×10^4 M⁻¹/giây. Tốt hơn là, một kháng thể theo sáng chế có thể được nói là liên kết với α -synuclein hoặc mảnh hoặc biến thể của nó với tỷ lệ (k(on)) lớn hơn hoặc bằng 10^5 M⁻¹/giây, 5×10^5 M⁻¹/giây, 10^6 M⁻¹/giây, hoặc 5×10^6 M⁻¹/giây hoặc 10^7 M⁻¹/giây.

Một phân tử liên kết, ví dụ, một kháng thể được nói là nó liên kết ức chế cạnh tranh kháng thể tham chiếu với một epitop cụ thể nếu nó liên kết ưu tiên với epitop đó tới mức mà nó phong bế, với một mức độ, liên kết của kháng thể tham chiếu với epitop đó. Ức chế cạnh tranh có thể được xác định bằng phương pháp đã biết bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này, lấy ví dụ, các phương pháp phân tích ELISA cạnh tranh. Một kháng thể có thể được nói là nó liên kết ức chế cạnh tranh của kháng thể tham chiếu với epitop cụ thể bằng ít nhất 90%, ít nhất 80%, ít nhất 70%, ít nhất 60%, hoặc ít nhất 50%.

Theo sáng chế, thuật ngữ "ái tính" chỉ một giá trị cường độ liên kết của một epitop riêng lẻ với CDR của phân tử liên kết, ví dụ, một phân tử globulin miễn dịch; ví dụ, xem: Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed. (1988) các trang 27-28. Theo sáng chế, thuật ngữ "háo tính" chỉ tính ổn định toàn vẹn của phức hợp trong quần thể các globulin miễn dịch với một kháng nguyên, đó là, cường độ liên kết chức năng của một phức hợp globulin miễn dịch với kháng nguyên đó; ví dụ, xem Harlow các trang 29-34. Háo tính liên quan đến cả ái tính của phân tử globulin miễn dịch riêng lẻ trong quần thể với các epitop đặc hiệu, và cũng liên quan đến hóa trị của các globulin miễn dịch đó với kháng nguyên. Lấy ví dụ, tương tác giữa kháng thể đơn dòng hóa trị hai và một kháng nguyên với cấu trúc epitop lặp lại cao, như là một polyme, có thể là một háo tính cao. Háo tính hoặc ái tính của một kháng thể đối với một kháng nguyên có thể được xác định về mặt thực nghiệm bằng cách sử dụng các phương pháp thích hợp; lấy ví dụ, xem: Berzofsky et

al., "Antibody-Antigen Interactions" In Fundamental Immunology, Paul, W. E., Ed., Raven Press New York, N Y (1984), Kuby, Janis Immunology, W. H. Freeman and Company New York, N Y (1992), và các phương pháp được mô tả theo sáng chế. Các kỹ thuật chung để xác định ái tính của một kháng thể đối với một kháng nguyên bao gồm ELISA, RIA, và cộng hưởng từ bề mặt. Ái tính được xác định của tương tác kháng nguyên-kháng thể cụ thể có thể khác nhau nếu đo trong các điều kiện khác nhau, ví dụ, nồng độ muối, độ pH. Vì vậy, việc đo ái tính và các thông số liên kết kháng nguyên khác, ví dụ, K_D , IC_{50} , ưu tiên thực hiện với các dung dịch kháng thể và kháng nguyên chuẩn, và dung dịch đệm được chuẩn hóa.

Các phân tử liên kết, ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế cũng có thể được mô tả hoặc thiết lập trong các điều kiện của phản ứng chéo của nó. Theo sáng chế, thuật ngữ "tính phản ứng chéo" chỉ khả năng của kháng thể, cụ thể là với một kháng nguyên, để phản ứng với kháng nguyên thứ hai; một phép đo liên quan giữa hai cơ chất kháng nguyên khác nhau. Vì vậy, một kháng thể phản ứng chéo nếu nó liên kết với một epitop khác ngoài một epitop mà cảm ứng sự tạo thành của nó. Epitop phản ứng chéo nói chung có chứa một số dấu hiệu cấu trúc hỗ trợ giống như epitop cảm ứng, và trong một số trường hợp, có thể thực sự thích hợp hơn dạng nguyên gốc.

Lấy ví dụ, các kháng thể cụ thể có một số mức phản ứng chéo, trong đó chúng liên kết với các epitop liên quan với nhau nhưng không giống hệt nhau, ví dụ, các epitop có độ tương đồng ít nhất 95%, ít nhất 90%, ít nhất 85%, ít nhất 80%, ít nhất 75%, ít nhất 70%, ít nhất 65%, ít nhất 60%, ít nhất 55%, và ít nhất 50% (như được tính toán bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và các phương pháp được mô tả theo sáng chế) với một epitop tham chiếu. Một kháng thể có thể được nói là có ít hoặc không có phản ứng chéo nếu nó không liên kết với các epitop có độ tương đồng thấp hơn 95%, thấp hơn 90%, thấp hơn 85%, thấp hơn 80%, thấp hơn 75%, thấp hơn 70%, thấp hơn 65%, thấp hơn 60%, thấp hơn 55%, và thấp hơn 50% (như được tính toán bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và các phương pháp được mô tả theo sáng chế) với một epitop tham chiếu. Một kháng thể có thể được xem như "đặc hiệu cao" đối với epitop cụ thể, nếu nó không liên kết với các thể tương đồng, epitop tiến hóa thẳng hoặc dạng tương đương của epitop đó.

Các phân tử liên kết, ví dụ, các kháng thể hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể hoặc các dẫn xuất của chúng theo sáng chế cũng có thể được mô tả hoặc thiết lập trong điều kiện ái lực liên kết của chúng với α -synuclein. Các ái lực liên kết tốt hơn bao gồm các ái lực với hằng số phân ly hoặc K_d thấp hơn 5×10^{-2} M, 10^{-2} M, 5×10^{-3} M, 10^{-3} M, 5×10^{-4} M, 10^{-4} M, 5×10^{-5} M, 10^{-5} M, 5×10^{-6} M, 10^{-6} M, 5×10^{-7} M, 10^{-7} M, 5×10^{-8} M, 10^{-8} M, 5×10^{-9} M, 10^{-9} M, 5×10^{-10} M, 10^{-10} M, 5×10^{-11} M, 10^{-11} M, 5×10^{-12} M, 10^{-12} M, 5×10^{-13} M, 10^{-13} M, 5×10^{-14} M, 10^{-14} M, 5×10^{-15} M, hoặc 10^{-15} M.

Như đã nêu ở trên, các cấu trúc tiểu đơn vị và cấu hình không gian ba chiều của các vùng hằng định của nhiều lớp globulin miễn dịch khác nhau là đã được biết rõ. Theo sáng chế, thuật ngữ "vùng V_H " bao gồm vùng biến đổi ở đầu amin trong chuỗi nặng của globulin miễn dịch và thuật ngữ "vùng $CH1$ " bao gồm vùng hằng định thứ nhất (chủ yếu ở đầu amin) trong chuỗi nặng của globulin miễn dịch. Vùng $CH1$ này liên kết với vùng V_H và là đầu amin với vùng bản lề trong phân tử chuỗi nặng của globulin miễn dịch.

Theo sáng chế, thuật ngữ "vùng $CH2$ " bao gồm phần phân tử chuỗi nặng mà nó kéo dài, ví dụ, từ gốc 244 đến gốc 360 của một kháng thể bằng cách sử dụng các sơ đồ đánh số thông thường (các gốc từ 244 đến 360, hệ thống đánh số Kabat; và các gốc 231-340, hệ thống đánh số EU; xem: Kabat EA et al. op. cit). Vùng $CH2$ này là duy nhất bởi vì nó không bắt cặp chặt chẽ với vùng khác. Đôi khi, hai chuỗi carbohydrat phân nhánh liên kết đầu N được kẹp giữa hai vùng $CH2$ của phân tử IgG nguyên bản không bị thay đổi. Các tài liệu đã chỉ ra rằng vùng $CH3$ kéo dài từ vùng $CH2$ đến đầu C của phân tử IgG và bao gồm khoảng 108 gốc.

Theo sáng chế, thuật ngữ "vùng bản lề" bao gồm phần phân tử chuỗi nặng mà kết nối từ vùng $CH1$ đến vùng $CH2$. Vùng bản lề này bao gồm khoảng 25 gốc và linh động, do đó nó cho phép hai vùng liên kết với kháng nguyên của đầu N di chuyển một cách độc lập. Các vùng bản lề này có thể phân chia tiếp thành ba vùng cụ thể: vùng bản lề trên, vùng bản lề giữa và vùng bản lề dưới; xem: Roux et al., J. Immunol. 161 (1998), 4083.

Theo sáng chế thuật ngữ "liên kết disulfid" bao gồm liên kết đồng hóa trị được hình thành giữa hai nguyên tử lưu huỳnh. Axit amin cysteine có một nhóm thiol có thể tạo ra một liên kết disulfid hoặc cầu nối với một nhóm thiol thứ hai. Trong phần lớn phân tử IgG xuất hiện trong tự nhiên, vùng $CH1$ và CL được liên kết với nhau bằng

một liên kết disulfit và hai chuỗi nặng được liên kết với nhau bằng hai liên kết disulfit ở các vị trí 239 và 242 tương ứng theo hệ thống đánh số Kabat (vị trí 226 hoặc 229, hệ thống đánh số EU).

Theo sáng chế, thuật ngữ "được liên kết", "được dung hợp" hoặc "dung hợp" được sử dụng thay thế cho nhau. Các thuật ngữ này chỉ việc gắn kết với nhau của hai thành phần hoặc nhiều hơn hoặc cấu tử, tất nhiên nghĩa của nó bao hàm cả tiếp hợp hóa học hoặc các công cụ tái tổ hợp. Một "sự dung hợp đúng khung" chỉ việc gắn kết hai hoặc nhiều khung đọc mở polynucleotit ORF (ORF: open reading frame) để tạo thành ORF liên tục dài hơn, theo cách duy trì khung đọc dịch mã đúng của các ORF ban đầu. Vì vậy, một protein dung hợp tái tổ hợp là một protein đơn lẻ có chứa hai hoặc nhiều đoạn tương ứng với các polypeptit được mã hóa bởi các ORF ban đầu đó (các đoạn này bình thường không gắn kết với nhau trong tự nhiên). Mặc dù, vì khung đọc tiếp tục được tạo ra thông qua các đoạn được dung hợp đó nên các đoạn được dung hợp này có thể được phân tách về mặt vật lý hoặc không gian bởi, lấy ví dụ, trình tự liên kết đúng khung. Lấy ví dụ, các polynucleotit mã hóa các CDR của vùng biến đổi của globulin miễn dịch có thể được dung hợp, đúng khung, nhưng được phân tách bởi một polynucleotit mã hóa cho ít nhất một vùng khung hoạt động của globulin miễn dịch hoặc các vùng CDR bổ sung, miễn là các CDR "được dung hợp" được đồng dịch mã như một phần của polypeptit liên tục.

Thuật ngữ "biểu hiện" theo sáng chế chỉ một quy trình mà theo quy trình này gen sản sinh một chất hóa sinh, lấy ví dụ, ARN hoặc polypeptit. Quy trình này bao gồm việc biểu thị bất kỳ sự có mặt chức năng của gen đó trong tế bào, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, gen bị loại bỏ cũng như cả việc biểu hiện tạm thời và biểu hiện ổn định. Sự biểu thị bao gồm, nhưng không giới hạn ở, việc phiên mã của gen thành ARN thông tin (mARN), tARN vận chuyển (tARN), ARN nhỏ dạng kẹp tóc (shARN), ARN can thiệp nhỏ (siARN) hoặc các sản phẩm ARN bất kỳ khác, và việc dịch mã của các mARN như vậy thành (các) polypeptit. Nếu sản phẩm cuối cùng mong muốn là một sản phẩm hóa sinh thì việc biểu hiện bao gồm việc tạo ra sản phẩm hóa sinh đó và các tiền chất bất kỳ. Biểu hiện của gen sản sinh ra "sản phẩm gen". Theo sáng chế, sản phẩm gen có thể là một axit nucleic, ví dụ, ARN thông tin được sinh ra bởi sự phiên mã gen, hoặc polypeptit được dịch mã từ một bản sao. Các sản phẩm của gen được mô tả theo sáng chế còn gồm các axit nucleic với các cải biến sau phiên mã, ví dụ,

polyadenyl hóa, hoặc các polypeptit với những cải biến sau dịch mã, ví dụ, methyl hóa, glycosyl hóa, gắn lipid, gắn với các tiểu phần protein khác, thủy phân protein, và các cải biến tương tự.

Theo sáng chế, thuật ngữ "mẫu" chỉ vật liệu sinh học bất kỳ thu được từ đối tượng hoặc bệnh nhân. Theo một phương án, mẫu có thể là máu, dịch não tủy ("CSF"), hoặc nước tiểu. Trong một phương án khác, mẫu có thể bao gồm toàn bộ máu, huyết thanh, các tế bào B được làm giàu từ mẫu máu, và các tế bào nuôi cấy (ví dụ, tế bào B từ đối tượng). Mẫu cũng có thể bao gồm mẫu sinh thiết hoặc mẫu mô kể cả mô thần kinh. Trong một phương án khác, mẫu có thể bao gồm toàn bộ tế bào và/hoặc dịch dung giải tế bào. Các mẫu máu có thể thu nhận được bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong một phương án, khối lắng này có thể được tái huyền phù hóa bằng cách khuấy trộn tại 4°C trong 200µl đệm (Tris 20mM, độ pH=7,5, Nonidet 0,5%, EDTA 1mM, PMSF 1mM, NaCl 0,1M, chất ức chế proteaza IX Sigma, và chất ức chế 1 và 2 của phosphotaza IX Sigma). Việc huyền phù hóa này có thể giữ trên nước đá trong 20 phút cùng với khuấy trộn gián đoạn. Sau khi quay với 15.000 x g trong 5 phút tại 4°C, phần dịch nổi có thể được bảo quản tại nhiệt độ khoảng -70°C.

Theo sáng chế, thuật ngữ "điều trị" hoặc "trị liệu" chỉ cả hai phương pháp điều trị bệnh và phòng ngừa hoặc ngăn ngừa bệnh, trong đó đối tượng được ngăn ngừa hoặc làm chậm (giảm bớt) một sự thay đổi sinh lý hoặc rối loạn sinh lý không mong muốn, như là sự phát triển bệnh Parkinson. Các kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn bao gồm, nhưng không hạn chế ở, việc làm nhẹ các triệu chứng, làm giảm phạm vi của bệnh, ổn định hóa (nghĩa là, không làm nặng thêm) bệnh trạng, trì hoãn hoặc làm chậm triệu chứng của bệnh, cải thiện hoặc làm giảm tình trạng bệnh, và giảm nhẹ (một phần hoặc toàn bộ), hoặc là nhận biết được hoặc là không nhận biết được. "Điều trị" cũng có thể mang nghĩa là kéo dài thời gian sống khi so với thời gian sống dự đoán nếu không tiếp nhận việc điều trị. Các đối tượng cần điều trị bao gồm những đối tượng đã mắc bệnh hoặc các rối loạn cũng như những đối tượng dễ bị mắc bệnh hoặc rối loạn đó hoặc những đối tượng mà biểu hiện bệnh trạng hoặc rối loạn đó được ngăn chặn.

Thuật ngữ "đối tượng" hoặc "cá thể" hoặc "động vật" hoặc "bệnh nhân" hoặc "động vật có vú" mang nghĩa là đối tượng bất kỳ, đặc biệt đối tượng là động vật có vú, ví dụ, người bệnh, mà chẩn đoán, dự đoán, ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh là mong muốn cho người đó.

II. Các kháng thể

Sáng chế đề cập chung đến các kháng thể kháng α -synuclein của người và các đoạn liên kết với kháng nguyên của nó, tốt hơn là thể hiện các tính chất liên kết miễn dịch và/hoặc các tính chất sinh học như đã được chỉ ra đối với kháng thể được minh họa trong các ví dụ. Theo sáng chế, các kháng thể đơn dòng của người đặc hiệu với α -synuclein được nhân dòng từ nhóm những cá thể lớn tuổi.

Trong các thực nghiệm được tiến hành theo sáng chế, các cố gắng ban đầu không thành công để nhân dòng được các kháng thể đặc hiệu với α -synuclein mà phần lớn thường thu được các dòng dương tính giả. Trong các nghiên cứu khác từ các dòng này vén mở là chúng sản sinh ra các kháng thể nhận biết các protein của *E. coli*. Mặt khác, để giải quyết vấn đề này, các kháng thể trong môi trường chọn lọc của dịch nuôi cấy tế bào B nhớ được sàng lọc đồng thời cùng tính liên kết với đơn thể α -synuclein được phủ có độ dài đầy đủ và không liên kết với các protein *E. coli* và albumin huyết thanh bò (BSA: bovine serum albumin). Cụ thể, môi trường chọn lọc tế bào B được tiên hấp thụ với các protein của *E. coli* trước khi thực hiện với môi trường cho phân tích ELISA để sàng lọc kháng thể của người liên kết với α -synuclein.

Các nỗ lực ban đầu để phân lập kháng thể đặc hiệu được tập trung vào nhóm người có hoạt tính liên kết cao của huyết thanh với α -synuclein, được cho rằng có các mức kháng thể huyết thanh α -synuclein cao trong hệ tuần hoàn. Bất ngờ là, các nỗ lực này không tạo ra được các tế bào B nhớ của người đặc hiệu với α -synuclein và các kháng thể được mô tả trong sáng chế này đã được phân lập từ nhóm đối tượng cao tuổi mà có phản ứng huyết thanh thấp với α -synuclein.

Theo phương pháp này, một số kháng thể có thể được phân lập. Các kháng thể lựa chọn được phân tích tiếp để xác định lớp và phân lớp chuỗi nhẹ. Sau đó, thông tin kháng thể liên quan được lựa chọn từ các môi trường nuôi cấy tế bào B nhớ được phiên mã bởi RT-PCR, nhân dòng và gắn vào vector biểu hiện để tạo sản phẩm tái tổ hợp; xem các ví dụ kèm theo. Việc biểu hiện kháng thể tái tổ hợp của người trong tế bào HEK293 hoặc tế bào CHO và nhận dạng tiếp các tính đặc hiệu liên kết trực tiếp với α -synuclein có chiều dài toàn vẹn và dạng cắt ngắn của nó (Fig. 2), trong phân tích thẩm tách Western (Fig. 4) cũng như với β và γ -synuclein (Fig. 3) đã xác nhận là lần đầu tiên các kháng thể của người đã được nhân dòng là có tính đặc hiệu cao đối với α -synuclein và nhận biết các epitop khác nhau trong protein α -synuclein.

Vì vậy, sáng chế đề cập chung đến kháng thể đơn dòng của người kháng α -synuclein được phân lập xuất hiện trong tự nhiên và các mảnh liên kết, các dẫn xuất và các biến thể của nó. Như được minh họa trong các Ví dụ và thể hiện trong Fig. 3, kháng thể đơn dòng của người kháng α -synuclein theo sáng chế có đặc điểm tốt hơn ở chỗ liên kết đặc hiệu với α -synuclein khi so với β -synuclein và γ -synuclein. Tốt hơn là, kháng thể này có khả năng liên kết đặc hiệu với α -synuclein ở dạng đơn thể nguyên thủy và/hoặc ở dạng oligo hoặc dạng kết tụ của nó. Ngoài ra, kháng thể kháng α -synuclein của người theo sáng chế có đặc trưng nữa ở khả năng nhận diện α -synuclein trong phương pháp phân tích thẩm tách Western; xem Fig. 4.

Theo một phương án, sáng chế đề cập trực tiếp đến kháng thể kháng α -synuclein, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể hoặc dẫn xuất của nó, trong đó kháng thể này liên kết một cách đặc hiệu với cùng epitop của α -synuclein như một kháng thể tham chiếu được chọn từ nhóm bao gồm NI-202.3G12, NI-202.12F4 hoặc NI-202.3D8. Như được minh họa trong các ví dụ, kháng thể NI-202.3G12 liên kết với kiểu đại (wt) của α -synuclein nhưng không liên kết với α -synuclein cắt ngắn trong phân tích ELISA trực tiếp, chỉ ra epitop cấu trúc của NI-202.3G12; xem Fig. 2A. Ngược lại, kháng thể NI-202.12F4 liên kết với các α -synuclein cắt ngắn có chứa vùng lặp lại kỵ nước và ưa nước đầu N (các axit amin 1-60) trong phân tích ELISA trực tiếp, chỉ ra epitop đầu N của NI-202.12F4; xem Fig. 2B. Ngoài ra, các kết quả sơ bộ trong các phân tích ELISA trực tiếp tiến hành với kháng thể NI-202.3D8 vén mở là NI-202.3D8 nhận biết một cách đặc hiệu đầu C của α -synuclein, tốt hơn là các axit amin 96-140.

Hơn thế nữa, không dự định ràng buộc vào các quan sát bằng thực nghiệm, các thí nghiệm sơ bộ khác đưa ra công nhận rằng kháng thể NI-202.3D8 liên kết ưu tiên với đơn thể α -synuclein hơn là các dạng sợi trong phân tích kháng thể ELISA trực tiếp, trong khi các kháng thể NI-202.12F4 và NI-202.3G12 ưu tiên liên kết với các α -synuclein kết tụ hoặc các dạng sợi hơn dạng α -synuclein đơn thể. Do đó, sáng chế đề cập đến một tập hợp kháng thể kháng α -synuclein của người với các độ đặc hiệu khác biệt, mà do đó một phần hữu dụng với mục đích ngăn ngừa và điều trị bệnh.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế có biểu hiện các tính chất liên kết của kháng thể NI-202.12F4 mẫu như được mô tả trong ví dụ bất kỳ trong số từ Ví dụ 1 đến 5. Lấy ví dụ, theo một phương án, kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế ưu

tiên nhận biết α -synuclein của người hơn là của chuột, cụ thể là khi được phân tích theo Ví dụ 3. Ngoài ra, hoặc cách khác, kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế ưu tiên nhận biết các dạng α -synuclein kết tụ hoặc gấp nếp sai hơn là các dạng α -synuclein đơn thể về mặt sinh lý, cụ thể là khi phân tích theo Ví dụ 3. Ngoài ra, hoặc cách khác, kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế liên kết với bệnh gây ra bởi đột biến α -synuclein của người, cụ thể là với những bệnh được mô tả trong Ví dụ 3. Theo ngữ cảnh này, tính đặc hiệu liên kết có thể nằm trong mức như được thể hiện với kháng thể NI-202.12F4 lấy làm ví dụ trong Fig. 5, nghĩa là có các nồng độ hiệu quả bán phần cao nhất (EC50) trong khoảng từ 100 đến 1000pM, tốt hơn là EC50 trong khoảng từ 100 đến 500pM đối với α -synuclein kiểu dại hoặc bệnh gây ra bởi thể đột biến của nó.

ndent, kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế tốt hơn là liên kết ưu tiên với các dạng α -synuclein gây bệnh trong não, ví dụ các dạng α -synuclein kết tụ gây bệnh như được minh họa bởi phân tích thẩm tách Western và nhuộm hóa mô miễn dịch được mô tả trong Ví dụ 3. Theo đó, trong một phương án bổ sung hoặc thay thế khác, kháng thể kháng α -synuclein theo sáng chế ưu tiên liên kết với epitop cấu hình α -synuclein của người và không liên kết đáng kể với các mảnh dẫn xuất đầu N của α -synuclein bao gồm các axit amin 1-20; 21-40; 41-60; 11-30; hoặc 31-50.

Sáng chế cũng phác họa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể hoặc dẫn xuất của nó, trong đó kháng thể bao gồm vùng liên kết với kháng nguyên giống với vùng này của kháng thể được chọn từ nhóm bao gồm NI-202.3G12, NI-202.12F4 hoặc NI-202.3D8.

Sáng chế còn minh họa một số phân tử liên kết như vậy, ví dụ các kháng thể và các mảnh liên kết với kháng nguyên của nó, đặc trưng ở chỗ có chứa vùng biến đổi của chúng, ví dụ vùng liên kết với ít nhất một vùng xác định tính hỗ trợ (CDR) của vùng biến đổi VH và/hoặc VL chứa các trình tự axit amin bất kỳ được minh họa trong Fig. 1. Các trình tự nucleotit tương ứng mã hóa cho các vùng biến đổi nêu trên được chỉ ra trong danh mục trình tự kèm theo. Tập hợp CDR lấy làm ví dụ về các trình tự axit amin đã nêu của vùng VH và/hoặc VL như được minh họa trong Fig. 1 cũng được chỉ ra trong danh mục trình tự kèm theo. Tuy nhiên, như được thảo luận dưới đây thì người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết được một thực tế là thêm vào hoặc cách khác có thể sử dụng các CDR mà có trình tự axit amin khác với trình tự

axit amin được nêu trong Fig. 1 bởi một, hai, ba hoặc thậm chí nhiều axit amin hơn trong trường hợp CDR2 và CDR3.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế là một kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể có chứa trình tự axit amin của vùng V_H và/hoặc V_L như được minh họa trong Fig. 1. Theo phương án khác, kháng thể theo sáng chế là một kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, dẫn xuất hoặc biến thể của nó, mà chúng liên kết cạnh tranh α -synuclein với ít nhất một trong số các kháng thể có vùng V_H và/hoặc V_L như được minh họa trong Fig. 1. Các kháng thể này có thể là kháng thể của người, cụ thể là với các ứng dụng trong điều trị bệnh. Theo phương án khác, kháng thể này là kháng thể của chuột, được làm tương thích với chuột và kháng thể khảm chuột-người, mà đặc biệt hữu dụng trong các phương pháp chẩn đoán và nghiên cứu trên động vật.

Như đã đề cập ở trên, với cách sản sinh theo đáp ứng miễn dịch của người, kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế sẽ nhận dạng các epitop liên quan cụ thể về mặt sinh lý và có thể không tiếp cận được hoặc gây miễn dịch kém trong trường hợp tiêm chủng để tạo ra, lấy ví dụ các kháng thể đơn dòng của chuột và trong sàng lọc thư viện biểu hiện thực khuẩn thể *in vitro*, một cách tương ứng. Do đó, cần cần trọng quy định là epitop của kháng thể kháng α -synuclein của người theo sáng chế là duy nhất và không có kháng thể nào khác có khả năng liên kết với epitop được nhận biết bởi kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế. Vì vậy, sáng chế cũng đề cập chung đến các kháng thể kháng α -synuclein và các phân tử liên kết với α -synuclein mà cạnh tranh với kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế để liên kết đặc hiệu với α -synuclein. Sáng chế cũng đề cập cụ thể đến kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể hoặc dẫn xuất của nó, trong đó kháng thể này liên kết một cách đặc hiệu với cùng epitop của α -synuclein như kháng thể tham chiếu được chọn từ nhóm bao gồm NI-202.3G12, NI-202.12F4 hoặc NI-202.3D8.

Liên kết cạnh tranh giữa các kháng thể được xác định bằng phương pháp phân tích trong đó globulin miễn dịch trong điều kiện thử nghiệm ức chế liên kết đặc hiệu của kháng thể tham chiếu với một kháng nguyên chung, như là α -synuclein. Đã biết một số loại phân tích liên kết cạnh tranh, lấy ví dụ: phân tích phóng xạ miễn dịch pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp (RIA: radioimmunoassay), phân tích miễn dịch enzym pha rắn trực tiếp hoặc gián tiếp (EIA: enzyme immunoassay), phân tích cạnh tranh kiểu bánh kẹp; xem: Stahli et al., *Methods in Enzymology* 9 (1983), 242-253; EIA biotin-

avidin trực tiếp pha rắn; xem Kirkland et al., J. Immunol. 137 (1986), 3614-3619 and Cheung et al., Virology 176 (1990), 546-552; phân tích đánh dấu trực tiếp pha rắn, phân tích dạng kẹp đánh dấu trực tiếp pha rắn; xem Harlow and Lane, Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Press (1988); đánh dấu trực tiếp pha rắn RIA bằng cách sử dụng nhãn đánh dấu I^{125} ; xem Morel et al, Molec. Immunol. 25 (1988), 7-15 and Moldenhauer et al., Scand. J. Immunol. 32 (1990), 77-82. Thông thường, những phương pháp phân tích như vậy liên quan đến sử dụng α -synuclein tinh sạch hoặc dạng kết tụ của nó liên kết với bề mặt pha rắn hoặc các tế bào mang một trong hai dạng này, globulin miễn dịch thử nghiệm không được đánh dấu và globulin miễn dịch tham chiếu được đánh dấu, nghĩa là kháng thể đơn dòng của người theo sáng chế. Ức chế cạnh tranh được xác định bằng cách xác định lượng I đánh dấu liên kết với bề mặt rắn hoặc tế bào có globulin miễn dịch thử nghiệm. Thông thường globulin miễn dịch thử nghiệm có mặt với một lượng dư. Tốt hơn là, phân tích liên kết cạnh tranh này được thực hiện trong các điều kiện đối với phân tích ELISA như đã nêu trong các Ví dụ đi kèm. Các kháng thể được xác định bằng phương pháp phân tích cạnh tranh (kháng thể cạnh tranh) bao gồm các kháng thể liên kết cùng với epitop như kháng thể tham chiếu và các kháng thể liên kết với một epitop liên kề đủ gần với epitop được liên kết bởi kháng thể tham chiếu để xuất hiện cản trở về mặt không gian. Thông thường, khi một kháng thể cạnh tranh có mặt với lượng dư, thì nó sẽ ức chế kháng thể tham chiếu liên kết với kháng nguyên chung đó ít nhất 50% hoặc 75%. Do đó, sáng chế còn minh họa một kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể hoặc dẫn xuất của nó, mà khi liên kết với α -synuclein các phân tử này ức chế cạnh tranh với kháng thể tham chiếu được chọn từ nhóm bao gồm NI-202.3G12, NI-202.12F4 hoặc NI-202.3D8.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch (V_H), trong đó có ít nhất một trong số các V_H -CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc ít nhất hai trong số các V_H -CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với các trình tự axit amin V_H -CDR1, V_H -CDR2 hoặc V_H -CDR3 tham chiếu của chuỗi nặng từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Theo phương án thay thế, vùng V_H -CDR1, V_H -CDR2 và V_H -CDR3 của V_H này có độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với trình tự axit amin V_H -CDR1, V_H -CDR2

và V_H-CDR3 tham chiếu của chuỗi nặng của kháng thể được mô tả theo sáng chế. Vì vậy, theo phương án này, vùng biến đổi chuỗi nặng theo sáng chế có trình tự polynucleotit V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 polypeptit liên quan đến các nhóm thể hiện trong Fig. 1. Trong khi Fig. 1 cho thấy V_H-CDR được xác định bằng hệ Kabat, các cách xác định CDR khác, ví dụ, các V_H-CDR được xác định bằng hệ thống Chothia, cũng thuộc phạm vi sáng chế, và có thể dễ dàng xác định bởi người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này bằng cách sử dụng dữ liệu trình bày trong Fig. 1.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch (V_H) trong đó các vùng V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 có trình tự polypeptit giống hệt với các nhóm V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 được thể hiện trong Fig. 1.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch (V_H) trong đó vùng V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 có độ tương đồng với trình tự polypeptit của nhóm V_H-CDR1, V_H-CDR2 và V_H-CDR3 được thể hiện trong Fig. 1, ngoại trừ có một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu gốc thể axit amin trong một V_H-CDR bất kỳ. Trong phương án cụ thể, gốc thể axit amin là gốc thể bảo toàn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch (V_L), trong đó có ít nhất một trong số các V_L-CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc ít nhất hai trong số các V_L-CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với trình tự axit amin của V_L-CDR1, V_L-CDR2 hoặc V_L-CDR3 tham chiếu của chuỗi nhẹ từ các kháng thể được mô tả theo sáng chế. Một phương án thay thế, các vùng V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 của V_L này có độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với trình tự axit amin V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 tham chiếu của chuỗi nhẹ từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Vì vậy, theo phương án này, một vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo sáng chế có trình tự polypeptit V_L-CDR1, V_L-CDR2 và V_L-CDR3 liên quan đến các polypeptit được thể hiện trong Fig. 1. Trong khi Fig. 1 cho thấy các V_L-CDR được xác định bằng hệ thống Kabat, các cách khác xác định CDR, ví dụ, các V_L-CDR được xác định bằng hệ thống Chothia, cũng thuộc phạm vi theo sáng chế.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch (V_L) trong đó vùng V_L -CDR1, V_L -CDR2 và V_L -CDR3 có trình tự polypeptit tương đồng với các nhóm V_L -CDR1, V_L -CDR2 và V_L -CDR3 được thể hiện trong Fig. 1.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (V_L) trong đó vùng V_L -CDR1, V_L -CDR2 và V_L -CDR3 có trình tự polypeptit tương đồng với nhóm V_L -CDR1, V_L -CDR2 và V_L -CDR3 được thể hiện trong Fig. 1, ngoại trừ có một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu gốc thế axit amin trong một V_L -CDR bất kỳ. Trong các phương án cụ thể các gốc thế axit amin này là gốc thế bảo toàn.

Một globulin miễn dịch hoặc cDNA mã hóa của nó có thể được cải biến tiếp. Vì vậy, trong một phương án khác, phương pháp theo sáng chế bao gồm một bước bất kỳ trong số (các) bước sản xuất kháng thể khảm, kháng thể được làm tương thích với chuột, kháng thể đơn chuỗi, mảnh Fab, kháng thể đặc hiệu đôi, kháng thể dung hợp, kháng thể đánh dấu hoặc một thể tương đồng của một dạng bất kỳ trong số các dạng này. Các phương pháp tương ứng là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả, ví dụ, trong Harlow và Lane "Antibodies, A Laboratory Manual", CSH Press, Cold Spring Harbor (1988). Khi các dẫn xuất của các kháng thể đã đề cập thu được bằng kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể, cộng hưởng bề mặt hạt nhân, như được sử dụng trong hệ thống BIAcore, có thể được sử dụng để làm tăng hiệu quả của kháng thể thực khuẩn thể mà kháng thể này liên kết với cùng epitop như liên kết của một kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được mô tả theo sáng chế (Schier, Human Antibodies Hybridomas 7 (1996), 97-105; Malmberg, J. Immunol. Methods 183 (1995), 7-13). Việc sản xuất các kháng thể khảm đã được mô tả, lấy ví dụ, trong công bố đơn quốc tế WO89/09622. Các phương pháp để sản xuất kháng thể được làm tương thích với người đã được mô tả trong, ví dụ, đơn sáng chế châu Âu EP-A1 0 239 400 và đơn quốc tế WO90/07861. Một nguồn kháng thể khác để sử dụng theo sáng chế còn được gọi là kháng thể ghép. Nguyên tắc chung để sản xuất kháng thể ghép như là các kháng thể giống kháng thể người trong chuột đã được mô tả, ví dụ, trong các công bố đơn quốc tế WO91/10741, WO94/02602, WO96/34096 và WO 96/33735. Như đã đề cập ở trên, kháng thể theo sáng chế có thể tồn tại ở nhiều dạng

khác nhau bên cạnh kháng thể toàn vẹn; bao gồm, lấy ví dụ, Fv, Fab và F(ab)₂, cũng như ở dạng các chuỗi đơn; ví dụ xem: công bố đơn quốc tế WO88/09344.

Các kháng thể theo sáng chế hoặc các chuỗi globulin miễn dịch tương ứng của chúng có thể được cải biến tiếp bằng cách sử dụng các kỹ thuật chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, lấy ví dụ, bằng việc loại bỏ, chèn thêm, thay thế, bổ sung các axit amin và/hoặc tái tổ hợp và/hoặc các cách cải biến bất kỳ khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này một cách đơn lẻ hoặc kết hợp với nhau. Các phương pháp tạo ra các cải biến trình tự ADN dựa trên cơ sở trình tự axit amin của một chuỗi globulin miễn dịch như vậy là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, xem: Sambrook, *Molecular Cloning A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory (1989) N.Y. and Ausubel, *Current Protocols in Molecular Biology*, Green Publishing Associates and Wiley Interscience, N.Y. (1994). Các cải biến của kháng thể theo sáng chế bao gồm các dẫn xuất hóa học và/hoặc enzym tại một hoặc nhiều axit amin cấu thành, bao gồm các cải biến chuỗi bên, các cải biến khung chính, và các cải biến đầu N và đầu C bao gồm axetyl hóa, hydroxyl hóa, methyl hóa, amit hóa, và gắn kết các gốc carbohydrat hoặc lipid, các đồng yếu tố, và các dạng tương tự. Tương tự như vậy, sáng chế còn bao hàm sản phẩm các protein khảm có chứa kháng thể được mô tả hoặc một số mảnh của nó được dung hợp tại đầu amin với phân tử tương đồng như là các phối tử kích thích miễn dịch tại đầu carboxyl; ví dụ, xem công bố đơn quốc tế WO00/30680 để có các chi tiết kỹ thuật tương ứng.

Ngoài ra, sáng chế bao hàm các peptit gồm các peptit chứa phân tử liên kết đã được mô tả ở trên, lấy ví dụ có chứa vùng CDR3 của vùng biến đổi của một kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể được đề cập, ví dụ chứa CDR3 của chuỗi nặng do thường được quan sát thấy là CDR3 trong chuỗi nặng (HCDR3: heavy chain CDR3) là vùng có độ biến đổi lớn và dễ dàng tham gia phản ứng kháng nguyên-kháng thể. Các peptit như vậy có thể dễ dàng được tổng hợp hoặc được sản xuất bằng các công cụ tái tổ hợp để tạo ra một tác nhân liên kết hữu dụng theo sáng chế. Các phương pháp như vậy là đã biết đối với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các peptit có thể được tổng hợp, lấy ví dụ, bằng cách tổng hợp peptit tự động mà đã được thương mại hóa. Các peptit này cũng có thể được sản xuất bằng các kỹ thuật tái tổ hợp bằng cách đưa ADN biểu hiện peptit này vào vectơ biểu hiện và chuyển vào tế bào với vectơ biểu hiện này để tạo ra sản phẩm peptit đó.

Do đó, sáng chế đề cập đến phân tử liên kết bất kỳ, ví dụ, kháng thể hoặc mảnh liên kết của nó mà được định hướng là các kháng thể kháng α -synuclein của người theo sáng chế và biểu hiện các tính chất đã được đề cập, nghĩa là nó nhận biết α -synuclein một cách đặc hiệu. Các kháng thể và phân tử liên kết như vậy có thể được kiểm tra tính đặc hiệu liên kết và ái lực bởi ELISA hoặc phương pháp phân tích thẩm tách Western hoặc hóa mô miễn dịch như được mô tả theo sáng chế, ví dụ, xem trong các Ví dụ. Hơn thế nữa, các kết quả sơ bộ của thí các thực nghiệm tiếp theo được tiến hành theo sáng chế vén mở là kháng thể kháng α -synuclein của người theo sáng chế, cụ thể là kháng thể NI-202.12F4 nhận diện các thể không tan của α -synuclein có mặt trong mô não của bệnh nhân bị tổn thương bởi thể Lewy (DLB) hoặc bệnh Parkinson (PD). Vì vậy, trong một phương án ưu tiên cụ thể, kháng thể của người hoặc mảnh liên kết, dẫn xuất hoặc biến thể của nó nhận biết α -synuclein trong mẫu não của người bị DLB hoặc PD.

Theo một phương án thay thế để thu globulin miễn dịch trực tiếp từ môi trường nuôi cấy các tế bào B bất tử hoặc các tế bào B nhớ, tế bào bất tử này có thể được sử dụng như một nguồn các locus chuỗi nặng và chuỗi nhẹ tái sắp xếp đối với biểu hiện tiếp theo và/hoặc thao tác di truyền. Gen tái sắp xếp của kháng thể này có thể được phiên mã ngược từ các mARN thích hợp để tạo ra cDNA. Nếu muốn, vùng hằng định chuỗi nặng có thể được thay thế bởi các lớp khác hoặc được loại bỏ hoàn toàn. Các vùng biến đổi có thể được liên kết để mã hóa vùng Fv chuỗi đơn. Nhiều vùng Fv có thể được liên kết để tạo ra khả năng liên kết với một hoặc nhiều đích hoặc các dạng kết hợp khảm của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được sử dụng. Một khi vật liệu di truyền có sẵn thì việc thiết kế các thể tương đồng được mô tả ở trên mà vẫn duy trì được khả năng liên kết của chúng với đích mong muốn là không khó khăn. Các phương pháp để nhân dòng các vùng biến đổi của kháng thể và tạo ra các kháng thể tái tổ hợp là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và đã được mô tả, lấy ví dụ, Gilliland et al., *Tissue Antigens* 47 (1996), 1-20; Doenecke et al., *Leukemia* 11 (1997), 1787-1792.

Một khi thu được vật liệu di truyền thích hợp và, nếu muốn, cải biến để mã hóa thể tương đồng, trình tự mã hóa, bao gồm các trình tự mà nó mã hóa, tối thiểu, các vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, có thể được chèn vào các hệ biểu hiện chứa trong các vectơ mà vectơ này có thể được lây nhiễm vào các tế bào chủ tái tổ hợp

chuẩn. Có nhiều loại tế bào chủ như vậy có thể được sử dụng; tuy nhiên, để thực hiện hiệu quả, ưu tiên là các tế bào động vật có vú. Các dòng tế bào động vật có vú thông thường hữu dụng cho mục đích này bao gồm, nhưng không hạn chế ở, các tế bào CHO, các tế bào HEK 293, hoặc các tế bào NSO.

Sau đó, việc sản xuất kháng thể hoặc thể tương đồng được thực hiện bằng cách nuôi cấy vật chủ tái tổ hợp được cải biến trong các điều kiện nuôi cấy thích hợp đối với sự sinh trưởng của các tế bào chủ đó và biểu hiện các trình tự mã hóa. Tiếp đó, kháng thể này được thu hồi bằng cách phân lập chúng ra khỏi môi trường nuôi cấy. Các hệ biểu hiện được thiết kế tốt hơn để chứa các peptit tín hiệu sao cho các kháng thể thu được này được tiết vào môi trường; Tuy nhiên, đó cũng có thể là các sản phẩm nội bào.

Theo đề cập ở trên, sáng chế cũng liên quan đến polynucleotit mã hóa kháng thể hoặc hoặc phân tử liên kết tương đương theo sáng chế, trong trường hợp là kháng thể, tốt hơn là có ít nhất một vùng biến đổi của chuỗi globulin miễn dịch của kháng thể được mô tả ở trên. Thông thường, vùng biến đổi này được mã hóa bởi polynucleotit có chứa ít nhất một vùng xác định bổ trợ (CDR) của vùng biến đổi VH và/hoặc VL của kháng thể được đề cập đó.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng nhận ra rằng vùng biến đổi của kháng thể có vùng biến đổi được mô tả ở trên có thể được sử dụng để xây dựng các polypeptit hoặc kháng thể khác với tính đặc hiệu và chức năng mong muốn. Vì vậy, sáng chế cũng bao hàm các polypeptit và kháng thể có chứa ít nhất một CDR của vùng biến đổi đã được đề cập ở trên và thuận lợi về cơ bản có các tính chất liên kết giống hoặc tương tự như kháng thể được mô tả trong các ví dụ kèm theo. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này biết là ái lực liên kết có thể được tăng cường bằng cách tạo ra các nhóm thế axit amin trong các CDR hoặc trong vùng vòng siêu biến (Chothia và Lesk, *J. Mol. Biol.* 196 (1987), 901-917) mà các vùng này trùng lặp một phần với các CDR được xác định bởi Kabat; ví dụ, xem: Riechmann, et al, *Nature* 332 (1988), 323-327. Vì vậy, sáng chế cũng đề cập đến các kháng thể, trong đó một hoặc nhiều CDR được đề cập này có chứa một hoặc nhiều, tốt hơn là không quá hai gốc thế axit amin. Tốt hơn là, kháng thể theo sáng chế có chứa hai hoặc tất cả ba CDR của các vùng biến đổi như được mô tả trong Fig. 1 trong một hoặc cả hai chuỗi globulin miễn dịch của nó.

Các phân tử liên kết, ví dụ, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế, như đã biết đối với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể chứa một vùng hằng định điều hòa một hoặc nhiều chức năng phản ứng kích thích. Lấy ví dụ, liên kết với thành phần bổ thể C1 với vùng hằng định của kháng thể có thể hoạt hóa hệ thống bổ thể. Việc hoạt hóa bổ thể là quan trọng trong việc opsoni hóa và dung giải các nguồn gây bệnh tế bào. Việc hoạt hóa bổ thể cũng kích thích đáp ứng viêm nhiễm và cũng có thể liên quan đến tính miễn cảm tự miễn. Hơn thế nữa, các kháng thể liên kết với các thụ thể trên nhiều loại tế bào thông qua vùng Fc này, với vị trí liên kết thụ thể Fc trên vùng kháng thể Fc liên kết với thụ thể Fc (FcR) trên tế bào. Có một lượng thụ thể Fc đặc hiệu với các lớp kháng thể khác nhau, bao gồm IgG (thụ thể gamma), IgE (thụ thể epsilon), IgA (thụ thể alpha) và IgM (thụ thể mu). Việc liên kết của kháng thể với các thụ thể Fc trên bề mặt tế bào khởi sự một loạt đáp ứng sinh học quan trọng và đa dạng bao gồm việc nhấn chìm và phá hủy các cấu trúc phủ kháng thể, loại bỏ hoàn toàn các phức hợp miễn dịch, dung giải các tế bào đích phủ kháng thể đó bởi tế bào tiêu diệt (gọi là gây độc tế bào qua trung gian bào phụ thuộc vào kháng thể, hoặc ADCC), giải phóng các chất trung gian gây viêm nhiễm, vận chuyển qua nhau thai và kiểm soát sản phẩm của globulin miễn dịch.

Do đó, các phương án cụ thể theo sáng chế bao gồm kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, trong đó có ít nhất một đoạn của một hoặc nhiều vùng hằng định bị loại bỏ hoặc được sửa đổi khác sao cho vẫn thu được các tính chất hóa sinh như các chức năng phản ứng kích thích bị giảm, khả năng dime hóa phi đồng hóa trị, tăng cường khả năng định vị tại vị trí kết tụ và lắng tụ của α -synuclein, làm giảm thời gian bán thải huyết thanh, hoặc tăng cường thời gian bán thải khi so sánh với kháng thể toàn vẹn, không biến đổi kháng thể có tính gây miễn dịch tương đương. Lấy ví dụ, các kháng thể cụ thể để sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán và điều trị được mô tả theo sáng chế là các kháng thể loại bỏ vùng mà có chứa chuỗi polypeptit tương tự với chuỗi nặng của globulin miễn dịch, nhưng thiếu ít nhất một hoặc nhiều vùng của chuỗi nặng. Lấy ví dụ về các kháng thể cụ thể, một vùng toàn vẹn của vùng hằng định của kháng thể được cải biến này sẽ bị loại bỏ, lấy ví dụ, một phần hoặc toàn bộ vùng CH2 sẽ bị loại bỏ. Trong các phương án khác, các kháng thể cụ thể để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán và điều trị được mô tả theo

sáng chế có vùng hằng định, ví dụ, vùng hằng định chuỗi nặng của IgG, mà nó được biến đổi để khử glycosyl hóa, là được đề cập chỗ khác theo sáng chế như là kháng thể aglycosyl hóa hoặc kháng thể "agly". Những kháng thể "agly" như vậy có thể được điều chế về mặt enzym cũng như bằng thao tác (các) vị trí glycosyl hóa liên ứng trong vùng hằng định này. Khi không bị ràng buộc theo lý thuyết, thì chắc chắn là kháng thể "agly" này có thể có đặc điểm về độ an toàn và độ ổn định được tăng cường *in vivo*. Các phương pháp tạo ra kháng thể được aglycosyl hóa, có chức năng phản ứng kích thích mong muốn đã được mô tả, lấy ví dụ trong công bố đơn quốc tế WO2005/018572, được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn.

Đối với các kháng thể cụ thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó được mô tả theo sáng chế, phần Fc này có thể bị đột biến để giảm chức năng phản ứng kích thích bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Lấy ví dụ, việc loại bỏ hoặc bất hoạt (thông qua các đột biến điểm hoặc các phương pháp khác) vùng hằng định có thể làm giảm liên kết thụ thể Fc của kháng thể cải biến trong hệ tuần hoàn, qua cách đó tăng sự khu trú α -synuclein. Trong các trường hợp khác có thể các cải biến vùng hằng định theo sáng chế điều hoà liên kết bất cặp và vì vậy làm giảm thời gian bán thải huyết thanh và kết hợp không đặc hiệu với độc tố tế bào tiếp hợp. Các phương án cải biến khác nữa của vùng hằng định này có thể được sử dụng để cải biến các liên kết disulfit hoặc các gốc oligosaccharit mà chúng cho phép tăng cường khu trú do tăng tính đặc hiệu kháng nguyên hoặc tăng tính linh động của kháng thể. Đặc điểm sinh lý tạo thành, sinh khả dụng và các tác động hóa sinh khác của các cải biến này, như là khu trú của α -synuclein, phân bố sinh học và thời gian bán thải huyết thanh, có thể dễ dàng được xác định và định lượng bằng cách sử dụng các kỹ thuật miễn dịch học đã biết mà không cần thực nghiệm.

Với các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất cụ thể của nó được mô tả theo sáng chế, phần Fc có thể bị đột biến hoặc trao đổi các trình tự protein lẫn nhau để tăng cường sự hấp thu tế bào của kháng thể theo cách, ví dụ bằng cách tăng cường quá trình nhập bào của kháng thể qua trung gian thông qua thụ thể Fc γ , LRP, hoặc thụ thể Thy1 hoặc bằng "kỹ thuật siêu kháng thể", mà kỹ thuật này được cho là làm cho kháng thể trở thành kháng thể con thoi trong tế bào sống mà không gây hại cho chúng (Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-

241). Lấy ví dụ, việc tạo ra các protein dung hợp của vùng liên kết kháng thể này và các phối tử protein cùng nguồn gốc của các thụ thể bề mặt tế bào hoặc các kháng thể đặc hiệu đôi và đa đặc hiệu với trình tự liên kết đặc hiệu với α -synuclein cũng như thụ thể bề mặt tế bào có thể thao tác được bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Với các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất cụ thể của nó được mô tả theo sáng chế, phần Fc có thể bị đột biến hoặc trao đổi lẫn nhau với các trình tự protein khác hoặc kháng thể này để có thể được cải biến hóa học làm tăng sự thâm nhập vào hàng rào máu não của nó.

Các dạng cải biến của kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được tạo ra từ kháng thể tiền thân hoặc kháng thể bố mẹ bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật đại diện được mô tả chi tiết hơn theo sáng chế. Các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được tạo ra hoặc sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Trong các phương án cụ thể, các phân tử kháng thể hoặc các mảnh của nó "được tạo ra bằng cách tái tổ hợp" nghĩa là, chúng được sản xuất bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Các kỹ thuật đại diện để tạo ra các phân tử kháng thể hoặc các mảnh của nó được mô tả chi tiết hơn theo sáng chế.

Các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế cũng bao gồm dẫn xuất được cải biến, ví dụ, bằng cách liên kết đồng hóa trị đôi với typ phân tử bất kỳ vào kháng thể sao cho liên kết đồng hóa trị không cản trở kháng thể đó liên kết đặc hiệu với epitop cùng nguồn gốc của nó. Lấy ví dụ, nhưng không làm hạn chế phạm vi của sáng chế, các dẫn xuất của kháng thể này bao gồm các kháng thể được cải biến, ví dụ, bằng cách glycosyl hóa, axetyl hóa, pegyl hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, tạo dẫn xuất bởi các nhóm bảo vệ/phong bế, phân cắt thủy phân, liên kết với phối tử của tế bào hoặc các protein khác, v.v. Cải biến bất kỳ trong số các cải biến hóa học có thể được thực hiện bởi các kỹ thuật đã biết, bao gồm, nhưng không giới hạn ở phân cắt đặc hiệu hóa học, axetyl hóa, formyl hóa, tổng hợp chuyển hóa tunicamycin, v.v. Ngoài ra, dẫn xuất này có thể chứa một hoặc nhiều axit amin không kinh điển.

Theo các phương án ưu tiên cụ thể, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế không gây ra đáp ứng miễn dịch có hại trong động vật được điều trị, ví dụ, trong người. Trong các phương án cụ thể, các phân tử liên kết, ví dụ, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế có nguồn gốc từ bệnh nhân, ví dụ, bệnh nhân là người, và được sử dụng kế tiếp trong cùng loài mà nó thu được, ví dụ, sử dụng cho người, làm giảm hoặc tối thiểu hóa sự xuất hiện những đáp ứng miễn dịch nguy hại.

Việc không chủng ngừa cũng có thể được sử dụng để làm giảm tính gây miễn dịch của kháng thể. Theo sáng chế, thuật ngữ "không chủng ngừa" bao gồm việc thay đổi một kháng thể bằng các epitop tế bào T cải biến; ví dụ, xem: công bố đơn quốc tế WO98/52976 và WO00/34317. Đối với trình tự, ví dụ, V_H và V_L từ kháng thể khởi đầu được phân tích và "lập bản đồ" epitop tế bào T của người từ từng vùng V thể hiện vị trí của các epitop này liên quan đến các vùng xác định bổ sung (CDR) và các gốc quan trọng khác nằm trong trình tự đó. Các epitop của mỗi tế bào T từ bản đồ epitop tế bào T này được phân tích với mục đích xác định các nhóm thể axit amin thay đổi có nguy cơ thấp trong việc thay đổi hoạt tính kháng thể cuối cùng. Hàng loạt trình tự V_H và V_L khác nhau được thiết kế có chứa các gốc thể axit amin kết hợp và các trình tự này được kết hợp tiếp theo vào dãy các polypeptit liên kết đó, ví dụ, các kháng thể đặc hiệu với α -synuclein hoặc các mảnh miễn dịch đặc hiệu của nó để sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán và điều trị như được mô tả theo sáng chế, mà sau đó được kiểm tra chức năng. Thông thường, có khoảng 12 đến 24 kháng thể biến thể được tạo ra và thử nghiệm. Các gen chuỗi nặng và chuỗi nhẹ hoàn thiện có chứa vùng V và vùng C cải biến của người khi đó được nhân dòng trong các vector biểu hiện và các plasmid tiếp đó được đưa vào các dòng tế bào để sản sinh ra kháng thể toàn vẹn. Tiếp đó, các kháng thể này được so sánh bằng các phương pháp phân tích sinh học và sinh hóa thích hợp, để xác định biến thể tối ưu.

Các kháng thể đơn dòng có thể được điều chế bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm sử dụng tế bào lai, tái tổ hợp, và kỹ thuật biểu hiện thực khuẩn thể, hoặc dạng kết hợp của chúng. Lấy ví dụ, các kháng thể đơn dòng này có thể được sản xuất bằng cách sử dụng kỹ thuật tế bào lai bao gồm các kỹ thuật đã biết và được giảng dạy trong lĩnh vực kỹ thuật này, lấy ví dụ, trong: Harlow et al., *Antibodies: A Laboratory Manual*, Cold Spring Harbor Laboratory Press, 2nd ed.

(1988); Hammerling et al., trong: Monoclonal Antibodies and T-Cell Hybridomas Elsevier, N.Y., 563-681 (1981), các kỹ thuật này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" theo sáng chế không giới hạn ở các kháng thể được sản xuất thông qua kỹ thuật tế bào lai. Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" chỉ kháng thể có nguồn gốc từ dòng tế bào đơn, bao gồm tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thực, hoặc dòng thực khuẩn thể, và không bao gồm phương pháp tạo ra nó. Vì vậy, thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" không giới hạn ở các kháng thể được tạo ra thông qua kỹ thuật tế bào lai. Trong các phương án cụ thể, kháng thể theo sáng chế có nguồn gốc từ tế bào B bất tử thông qua biến nạp với virus Epstein-Barr, như được mô tả theo sáng chế.

Trong các quy trình tế bào lai đã biết (Kohler et al., Nature 256 (1975), 495) các tế bào lympho có thời gian sống tương đối ngắn, hoặc bị chết, từ động vật có vú, ví dụ, các tế bào B từ đối tượng là người như được mô tả theo sáng chế, được dung hợp với dòng tế bào khối u bất tử (ví dụ, dòng tế bào u tủy), vì vậy, việc tạo ra các tế bào lai hóa hoặc "tế bào lai" mà vừa bất tử và vừa có khả năng sản sinh ra kháng thể được mã hóa về mặt di truyền của tế bào B. Các tế bào lai thu được này được phân lập thành chủng đơn nhất về mặt di truyền bằng cách chọn lọc, pha loãng, và tái sinh với từng chủng đơn lẻ có chứa các gen đặc biệt hình thành kháng thể đơn. Các tế bào này tạo ra các kháng thể, mà các kháng thể này là đồng nhất kháng kháng nguyên mong muốn khi so sánh với dòng gen di truyền thuần chủng của bố mẹ, được gọi với thuật ngữ "đơn dòng".

Vì vậy, các tế bào lai được tạo ra bằng cách cấy và phát triển trong môi trường nuôi cấy thích hợp, tốt hơn là có chứa một hoặc nhiều chất ức chế sinh trưởng hoặc ức chế sự sống của tế bào u tủy bố mẹ không được dung hợp. Người có hiểu biết trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá được là các chất phản ứng các dòng tế bào và môi trường để hình thành, chọn lọc và sinh trưởng tế bào lai đã được thương mại hóa từ các nguồn và các giao thức chuẩn hóa đã được thiết lập cụ thể. Nói chung, môi trường nuôi cấy mà trong đó tế bào lai phát triển được kiểm tra đối với sự sản sinh của kháng thể đơn dòng kháng lại kháng nguyên mong muốn. Tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi các tế bào lai được xác định bằng các phương pháp phân tích *in vitro* như là kết tủa miễn dịch, phân tích miễn dịch phóng xạ (RIA: radioimmunoassay) hoặc phân tích miễn dịch liên kết enzym (ELISA) như được mô tả

theo sáng chế. Sau khi các tế bào lai được xác định là sản sinh ra kháng thể có tính đặc hiệu, ái tính và/hoặc hoạt tính mong muốn các dòng này có thể được nhân dòng tiếp bằng cách pha loãng giới hạn và sinh trưởng bằng các các phương pháp chuẩn; ví dụ, xem: Goding, *Monoclonal Antibodies: Principles and Practice*, Academic Press, pp 59-103 (1986). Được đánh giá hơn là các kháng thể đơn dòng tiết ra bởi các dòng sau, có thể được tách ra khỏi môi trường nuôi cấy, dịch sung cổ trướng hoặc huyết thanh bằng các kỹ thuật tinh sạch thông thường, lấy ví dụ, protein-A, sắc ký hydroxylapatit, điện di trên gel, thẩm tách hoặc sắc ký ái lực.

Theo một phương án khác, các tế bào lympho có thể được chọn lọc bằng vi thao tác và các phương pháp phân lập gen khác nhau. Lấy ví dụ, các tế bào máu đơn nhân ngoại vi có thể được phân lập từ động vật có vú miễn dịch tự nhiên hoặc được gây miễn dịch, ví dụ, trong con người và các tế bào lympho được nuôi cấy *in vitro* trong khoảng 7 ngày. Các môi trường nuôi cấy này có thể được sàng lọc với IgG đặc hiệu mà thỏa mãn các điều kiện sàng lọc. Các tế bào từ các giếng dương tính có thể được phân lập. Từng tế bào B sản xuất Ig có thể được phân lập bằng FACS hoặc bằng cách xác định chúng trong phương pháp phân tích huyết tán bất cặp trung gian. Các tế bào B sản xuất Ig có thể được vi thao tác trong ống nghiệm và gen V_H và V_L có thể được khuếch đại bằng cách sử dụng, ví dụ, RT-PCR. Các gen V_H và V_L có thể được nhân dòng trong vector biểu hiện kháng thể và chuyển nhiễm vào các tế bào (ví dụ, tế bào nhân thực hoặc tế bào nhân sơ) để biểu hiện.

Theo một phương án thay thế, các dòng tế bào sản sinh ra kháng thể có thể được chọn lọc và nuôi cấy bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết đối với những người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Những kỹ thuật như vậy đã được mô tả trong nhiều sổ tay phòng thí nghiệm và các ấn phẩm chính thức. Theo khía cạnh này, các kỹ thuật thích hợp để sử dụng theo sáng chế như được mô tả trong *Current Protocols in Immunology*, Coligan et al., Eds., Green Publishing Associates và Wiley-Interscience, John Wiley và Sons, New York (1991) được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, kể cả phần phụ bản.

Các mảnh kháng thể mà nhận biết các epitop đặc hiệu có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật đã biết. Lấy ví dụ, các mảnh Fab và $F(ab')_2$ có thể được tạo ra bằng cách tái tổ hợp hoặc bằng các phân tách thủy phân các phân tử globulin miễn dịch, bằng các sử dụng enzym như papain (để sản xuất mảnh Fab) hoặc pepsin (để sản xuất mảnh

$F(ab')_2$). Các mảnh $F(ab')_2$ có chứa vùng biến đổi, vùng hằng định chuỗi nhẹ và vùng CH1 của chuỗi nặng. Các mảnh như vậy là đủ để sử dụng, lấy ví dụ, trong các quy trình chẩn đoán miễn dịch liên quan đến việc bắt cặp các phần miễn dịch đặc hiệu của các globulin miễn dịch với các tác nhân phản ứng có thể nhận biết được như là các đồng vị phóng xạ.

Kháng thể toàn vẹn của người, như được mô tả theo sáng chế, là mong muốn đặc biệt để điều trị bệnh cho các bệnh nhân. Các kháng thể của người theo sáng chế được phân lập, ví dụ, từ những người cao tuổi mà ở độ tuổi đó nghi ngờ có nguy cơ phát triển các rối loạn, ví dụ, bệnh Parkinson, hoặc bệnh nhân mắc bệnh rối loạn nhưng đang ở giai đoạn bệnh ổn định bất thường. Tuy nhiên, mặc dù thận trọng cho rằng những người cao tuổi đó không có triệu chứng và khỏe mạnh, một cách tương ứng, thông thường, những người này sẽ phát triển kháng thể bảo vệ kháng α -synuclein hơn những người trẻ hơn, những người trẻ hơn này có thể được sử dụng như nguồn thu kháng thể của người theo sáng chế. Điều này đặc biệt đúng với các bệnh nhân trẻ tuổi, những người bị mắc bệnh synuclein dạng thông thường nhưng vẫn không có triệu chứng do hệ miễn dịch và các chức năng đáp ứng miễn dịch của họ có hiệu quả hơn những người cao tuổi.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất một CDR của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất hai CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất ba CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất bốn CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất năm CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Theo một phương án khác, kháng thể theo sáng chế chứa ít nhất sáu CDR từ một hoặc nhiều phân tử kháng thể. Các phân tử kháng thể điển hình có chứa ít nhất một CDR mà nó có thể bao gồm trong các kháng thể đối tượng được mô tả theo sáng chế.

Kháng thể theo sáng chế có thể được sản xuất bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để sinh tổng hợp kháng thể, cụ thể là, bằng kỹ thuật sinh tổng hợp hóa học hoặc tốt hơn là bằng kỹ thuật biểu hiện tái tổ hợp như được mô tả theo sáng chế.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế bao gồm vùng hằng định tổng hợp trong đó một hoặc nhiều vùng được loại bỏ một phần hoặc hoàn toàn ("kháng thể loại bỏ vùng"). Trong các phương án cụ thể kháng thể cải biến thích hợp sẽ bao gồm các cấu trúc loại bỏ vùng hoặc các biến thể trong đó toàn bộ vùng CH2 được loại bỏ (cấu trúc Δ CH2). Với các phương án khác, một peptit gắn kết ngắn có thể được thể cho vùng bị loại bỏ để tạo ra vùng biến đổi linh động, tự do di động. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này đánh giá là các cấu trúc như vậy đặc biệt thích hợp cho các tính chất điều hòa của vùng CH2 đối với tốc độ dị hóa của kháng thể đó. Các cấu trúc loại bỏ vùng có thể thu được bằng cách sử dụng vector mã hóa vùng hằng định IgG₁ của người, ví dụ, xem công bố đơn quốc tế WO02/060955 và WO02/096948A2. Vector này được thao tác loại bỏ vùng CH2 và tạo ra vector tổng hợp biểu hiện vùng hằng định IgG₁ được loại bỏ.

Trong các phương án cụ thể, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế là các cấu trúc protein liên kết với kháng nguyên. Các cấu trúc protein liên kết với kháng nguyên có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, xem: US 5.837.821 hoặc WO 94/09817.

Theo một phương án, kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó theo sáng chế có chứa chuỗi nặng của globulin miễn dịch được loại bỏ hoặc thay thế một vài hoặc thậm chí là một axit amin miễn là nó cho phép kết hợp giữa các tiểu đơn vị của đơn thể này. Lấy ví dụ, việc đột biến một axit amin đơn lẻ trong các vùng chọn lọc của vùng CH2 có thể đủ làm giảm về cơ bản liên kết Fc và do đó làm tăng sự khu trú của α -synuclein. Tương tự, nó có thể được mong muốn là đơn giản loại bỏ một phần của một hoặc nhiều vùng hằng định mà điều khiển chức năng phản ứng kích thích (nghĩa là liên kết bổ trợ) để được điều hòa. Những phần được loại bỏ như vậy của vùng hằng định có thể làm tăng các tính chọn lọc của kháng thể đó (thời gian bán thải huyết thanh) trong khi giữ lại các chức năng mong muốn liên quan đến vùng hằng định của đối tượng đó. Hơn nữa, như đã minh họa ở trên, các vùng hằng định của các kháng thể được bộc lộ này có thể tổng hợp thông qua đột biến hoặc thay thế một hoặc nhiều axit amin mà nó tăng cường đặc điểm của cấu trúc thu được. Theo khía cạnh này, nó có thể phá vỡ hoạt tính của vị trí liên kết bảo toàn đó (ví dụ

liên kết Fc) trong khi về cơ bản vẫn duy trì được hình thể và đặc điểm miễn dịch của kháng thể cải biến đó. Trong các phương án khác nữa bao gồm việc bổ sung một hoặc nhiều axit amin với vùng hằng định để tăng cường các tính chất mong muốn như là chức năng phản ứng kích thích hoặc cung cấp nhiều độc tính tế bào hoặc gắn kết carbohydrat hơn. Trong các phương án như vậy, có thể mong đợi từ việc chèn thêm hoặc tái bản trình tự đặc hiệu từ các miền của vùng hằng định được lựa chọn.

Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể có chứa, về cơ bản có chứa, hoặc bao gồm, các biến thể (bao gồm các dẫn xuất) của các phân tử kháng thể (ví dụ, vùng V_H và/hoặc vùng V_L) như được mô tả theo sáng chế, mà các kháng thể hoặc các mảnh của nó liên kết một cách đặc hiệu miễn dịch với α -synuclein. Các kỹ thuật chuẩn đã biết đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng để đưa các đột biến vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, đột biến điểm trực tiếp và đột biến thông qua PCR mà kết quả thu được các axit amin thay thế. Tốt hơn là, các biến thể này (bao gồm các dẫn xuất) mã hóa dưới 50 gốc thể axit amin, dưới 40 gốc thể axit amin, dưới 30 gốc thể axit amin, dưới 25 gốc thể axit amin, dưới 20 gốc thể axit amin, dưới 15 gốc thể axit amin, dưới 10 gốc thể axit amin, dưới 5 gốc thể axit amin dưới 4 gốc thể axit amin, dưới 3 gốc thể axit amin, hoặc dưới 2 gốc thể axit amin liên quan đến vùng V_H tham chiếu, vùng V_H -CDR1, V_H -CDR2, V_H -CDR3, V_L , V_L -CDR1, V_L -CDR2, hoặc V_L -CDR3. Một "gốc thể axit amin bảo toàn" là một gốc thể mà trong đó gốc axit amin này được thay thế bằng một gốc axit amin khác có chuỗi bên với độ tích điện tương tự. Các họ gốc axit amin có chuỗi bên với các độ tích điện tương tự đã được xác định trong lĩnh vực kỹ thuật này. Những họ này bao gồm các axit amin với các chuỗi bên bazơ (ví dụ, lysin, arginin, histidin), các chuỗi bên axit (ví dụ, axit aspartic, axit glutamic), các chuỗi bên không tích điện phân cực (ví dụ, glyxin, asparagin, glutamin, serin, threonin, tyrosin, xystein), chuỗi bên không phân cực (ví dụ, alanin, valin, leuxin, isoleuxin, prolin, phenylalanin, methionin, tryptophan), các chuỗi bên phân nhánh beta (ví dụ, threonin, valin, isoleuxin) và các chuỗi bên thơm (ví dụ, tyrosin, phenylalanin, tryptophan, histidin). Một phương án thay thế, các đột biến có thể được đưa một cách ngẫu nhiên vào một phần hoặc toàn bộ của trình tự mã hóa, như là bằng cách đột biến bão hòa, và các thể đột biến thu được có thể được sàng lọc hoạt tính sinh học để xác định các thể đột biến còn hoạt tính (ví dụ, khả năng liên kết với α -synuclein).

Lấy ví dụ, có thể đưa các đột biến chỉ vào trong vùng khung hoạt động hoặc trong các vùng CDR của phân tử kháng thể. Các đột biến đưa vào có thể là đột biến im lặng hoặc đột biến sai nghĩa trung tính, ví dụ, không hoặc ít ảnh hưởng đến khả năng liên kết của kháng thể đó với kháng nguyên, tuy nhiên, thực sự là một số đột biến như vậy không thay đổi bất kỳ trình tự axit amin. Các typ đột biến này có thể hữu dụng để tối ưu hóa bộ ba mã hóa hoặc để tăng cường sản sinh kháng thể từ tế bào lai. Các vùng mã hóa được tối ưu bộ ba mã hóa mã hóa các kháng thể theo sáng chế được mô tả theo sáng chế. Một phương án thay thế, các đột biến sai nghĩa không trung tính có thể thay đổi khả năng liên kết của kháng thể với kháng nguyên. Vị trí của phần lớn các đột biến im lặng hoặc đột biến sai nghĩa trung tính là có khả năng trong vùng khung hoạt động, trong khi vị trí các đột biến sai nghĩa không trung tính có khả năng là trong CDR, mặc dù điều này không thực sự cần thiết. Một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thiết kế và thử nghiệm các phân tử đột biến với các tính chất mong muốn như là không thay đổi hoạt tính liên kết với kháng nguyên hoặc thay đổi hoạt tính liên kết (ví dụ, tăng cường hoạt tính liên kết với kháng nguyên hoặc thay đổi tính đặc hiệu của kháng thể). Theo sau việc gây đột biến, protein được mã hóa có thể được biểu hiện hoạt tính sinh học và/hoặc chức năng theo cách thông thường của protein được mã hóa, (nghĩa là, khả năng liên kết đặc hiệu miễn dịch với ít nhất một epitop của α -synuclein) có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả theo sáng chế hoặc bằng cách các kỹ thuật cải biến thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

III. Polynucleotit mã hóa kháng thể

Một polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể chứa một polyribonucleotit hoặc polydeoxribonucleotit bất kỳ, mà nucleotit này có thể là ARN hoặc ADN không cải biến hoặc ARN hoặc ADN cải biến. Lấy ví dụ, một polynucleotit mã hóa một kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể chứa ADN sợi kép và sợi đơn, ADN mà là một phức hợp của vùng sợi kép và sợi đơn, ARN sợi kép và sợi đơn, và ARN mà là phức hợp của vùng sợi kép và sợi đơn, các phân tử lai có chứa ADN và ARN mà có thể là sợi đơn hoặc, cụ thể hơn là, sợi kép hoặc phức hợp của vùng sợi kép và sợi đơn. Ngoài ra, một polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể chứa các vùng

sợi ba có chứa ARN hoặc ADN hoặc cả ARN và ADN. Một polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó cũng có thể chứa một hoặc nhiều bazơ cải biến hoặc ADN hoặc ARN xuong sống được cải biến để tăng tính ổn định hoặc với lý do khác. Các bazơ "cải biến" bao gồm, lấy ví dụ, bazơ trityl hóa và bazơ khác thường như inosin. Nhiều cải biến có thể thực hiện với ADN và ARN; vì vậy, "polynucleotit" bao hàm các dạng được cải biến về mặt hóa học, enzym hoặc trao đổi chất.

Một polynucleotit được phân lập mã hóa biến thể không có trong tự nhiên của một polypeptit có nguồn gốc từ globulin miễn dịch (ví dụ, một phần chuỗi nặng hoặc phần chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch) có thể được tạo ra bằng cách đưa vào một hoặc nhiều gốc thể nucleotit, bổ sung hoặc loại bỏ trong trình tự nucleotit đó của globulin miễn dịch sao cho thay thế, bổ sung hoặc loại bỏ một hoặc nhiều axit amin được đưa vào trong protein được mã hóa đó. Các đột biến có thể đưa vào bởi các kỹ thuật chuẩn, như là đột biến điểm trực tiếp và đột biến thông qua PCR. Tốt hơn là, các gốc thể axit amin bảo toàn được thực hiện bởi một hoặc nhiều gốc axit amin không thiết yếu.

Đã biết rõ là ARN có thể được phân lập từ các tế bào B ban đầu, các tế bào lai hoặc từ các tế bào biến nạp khác bằng các kỹ thuật chuẩn, như là chiết guanidin isothioxyanat và sau đó kết tủa bằng ly tâm hoặc sắc ký. Nếu muốn, mARN có thể được phân lập từ ARN tổng số bằng các kỹ thuật chuẩn như là sắc ký trên oligo dT xenluloza. Các kỹ thuật thích hợp là thông dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một phương án, các cDNA mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể này có thể được tạo ra, hoặc là đồng thời hoặc kế tiếp nhau, bằng cách sử dụng enzym phiên mã ngược và ADN polymeraza theo các phương pháp đã biết. PCR có thể được khởi động bởi các đoạn môi vùng hằng định liên ứng hoặc bằng các đoạn môi đặc hiệu hơn dựa trên việc công bố ADN của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ và trình tự axit amin. Như đã đề cập ở trên, PCR cũng có thể được sử dụng để phân lập các dòng ADN mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể đó. Trong trường hợp này, các thư viện có thể được sàng lọc bằng các đoạn môi liên ứng hoặc các đoạn dò tương đồng lớn hơn, như là các đoạn dò vùng hằng định của người.

ADN, thường là ADN plasmit, có thể được phân lập từ các tế bào bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, như lập bản đồ giới hạn và giải

trình tự theo các kỹ thuật chuẩn đã biết được trình bày chi tiết, ví dụ, trong các viện dẫn đã được đề cập ở trên liên quan đến kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Tất nhiên là, ADN này có thể được sinh tổng hợp theo sáng chế tại thời điểm bất kỳ trong quy trình tinh sạch hoặc các phân tích tiếp theo.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch (V_H), trong đó có ít nhất một trong số các CDR của vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc ít nhất hai trong số các V_H -CDR vùng biến đổi chuỗi nặng có độ tương đồng ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với trình tự axit amin tham chiếu V_H -CDR1, V_H -CDR2, hoặc V_H -CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể được mô tả theo sáng chế. Một phương án khác, vùng V_H -CDR1, V_H -CDR2, hoặc V_H -CDR3 của V_H có độ tương đồng trình tự ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với trình tự axit amin tham chiếu V_H -CDR1, V_H -CDR2, và V_H -CDR3 của chuỗi nặng của kháng thể được mô tả theo sáng chế. Vì vậy, theo phương án này, vùng biến đổi chuỗi nặng theo sáng chế có trình tự polypeptit V_H -CDR1, V_H -CDR2, hoặc V_H -CDR3 liên quan đến trình tự polypeptit được thể hiện trong Fig. 1.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nhẹ (V_L) của globulin miễn dịch, trong đó ít nhất một trong số các V_L -CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc hai trong số các V_L -CDR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ có độ tương đồng về trình tự ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với trình tự axit amin V_L -CDR1, V_L -CDR2, hoặc V_L -CDR3 tham chiếu của chuỗi nhẹ từ kháng thể được mô tả theo sáng chế. Một phương án lựa chọn, vùng V_L -CDR1, V_L -CDR2, hoặc V_L -CDR3 của V_L có độ tương đồng về trình tự ít nhất 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với trình tự axit amin V_L -CDR1, V_L -CDR2, và V_L -CDR3 tham chiếu của chuỗi nhẹ của kháng thể được mô tả theo sáng chế. Vì vậy, theo phương án này, vùng biến đổi chuỗi nhẹ theo sáng chế có trình tự polypeptit V_L -CDR1, V_L -CDR2, hoặc V_L -CDR3 liên quan đến các trình tự polypeptit được thể hiện trong Fig. 1.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến polypeptit được phân lập có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm axit nucleic mã hóa vùng biến đổi chuỗi nặng (V_H) của globulin miễn dịch trong đó vùng V_H -CDR1, V_H -CDR2, và V_H -CDR3 có trình tự

polypeptit giống hệt với các nhóm V_H-CDR1, V_H-CDR2, và V_H-CDR3 được thể hiện trong Fig. 1 và trong danh mục trình tự kèm theo.

Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, "độ tương đồng trình tự" giữa hai polypeptit hoặc hai polynucleotit được xác định bằng cách so sánh trình tự axit amin hoặc trình tự axit nucleic của một polypeptit hoặc polynucleotit với trình tự của polypeptit hoặc polynucleotit thứ hai. Như được đề cập theo sáng chế, khi một polypeptit cụ thể bất kỳ có độ tương đồng về trình tự ít nhất khoảng 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70%, 75%, 80%, 85%, 90% hoặc 95% so với một polypeptit khác có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp và chương trình máy tính/phần mềm đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này như là, nhưng không giới hạn ở, 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 của Smith và Waterman, *Advances in Applied Mathematics* 2 (1981), 482-489, để tìm các đoạn tương đồng tốt nhất giữa hai trình tự. Khi sử dụng BESTFIT hoặc chương trình so sánh trình tự bất kỳ khác để xác định xem liệu một trình tự cụ thể nào đó mà, lấy ví dụ, có mức độ tương đồng 95% so với trình tự tham chiếu theo sáng chế, các thông số được đặt ra và tất nhiên, như là tỷ lệ phần trăm độ tương đồng được tính toán trên toàn bộ chiều dài của trình tự polypeptit tham chiếu đó và sao cho các khoảng cách gián đoạn trong thể tương đồng lên đến 5% của tổng lượng axit amin trong trình tự tham chiếu này là cho phép.

Trong một phương án ưu tiên theo sáng chế, polynucleotit này có chứa, chủ yếu chứa, hoặc bao gồm axit nucleic có trình tự polynucleotit của vùng V_H hoặc V_L của kháng thể kháng α -synuclein như được mô tả trong SEQ ID NOS: 2, 5, 8, 11, 14, 17 hoặc 20. Theo khía cạnh này, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ dễ dàng đánh giá được đâu là polynucleotit mã hóa ít nhất vùng biến đổi của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ mà có thể mã hóa vùng biến đổi của cả hai hoặc chỉ một chuỗi globulin miễn dịch đó.

Sáng chế cũng bao gồm các mảnh polynucleotit theo sáng chế, như được mô tả tại chỗ khác. Các polynucleotit khác mà mã hóa các polynucleotit dung hợp, các mảnh Fab, và các dẫn xuất khác, như được mô tả theo sáng chế, cũng thuộc phạm vi sáng chế.

Các polynucleotit có thể được tạo ra hoặc sản xuất bởi phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Lấy ví dụ, nếu trình tự nucleotit của kháng thể này là đã biết thì polynucleotit mã hóa kháng thể đó có thể được lắp ghép từ các oligonucleotit được tổng hợp hóa học, ví dụ, như được mô tả trong Kutmeier et al., *BioTechniques* 17 (1994), 242, mà, nói chung, liên quan đến việc tổng hợp các oligonucleotit trùng lặp có chứa trong các phần của trình tự mã hóa kháng thể đó, gắn và nối các oligonucleotit này, và tiếp đó khuếch đại các oligonucleotit được nối này bằng PCR.

Một phương án thay thế, một polynucleotit mã hóa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể được tạo ra bởi các axit nucleic từ nguồn thích hợp. Nếu không có dòng chứa axit nucleic mã hóa kháng thể cụ thể mà trình tự của phân tử kháng thể này là đã biết thì axit nucleic mã hóa kháng thể đó có thể được tổng hợp hóa học hoặc thu được từ nguồn thích hợp (ví dụ, từ thư viện kháng thể cDNA, hoặc thư viện cDNA được tạo ra từ, hoặc là axit nucleic, tốt hơn là từ polyA⁺ ARN, được phân lập từ mô hoặc các tế bào bất kỳ biểu hiện kháng thể đặc hiệu với α -synuclein, như là tế bào lai được lựa chọn để biểu hiện kháng thể), bởi khuếch đại PCR bằng cách sử dụng các đoạn mồi tổng hợp có thể lai với đầu 3' và đầu 5' của trình tự hoặc bằng các nhân dòng có sử dụng đầu dò oligonucleotit đặc hiệu đối với trình tự gen cụ thể để nhận biết, ví dụ, dòng cDNA từ thư viện cDNA mã hóa kháng thể đó. Các axit nucleic được khuếch đại bởi PCR khi đó có thể được nhân dòng trong các vectơ nhân dòng có thể tái bản bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Một khi trình tự nucleotit và trình tự axit amin tương ứng của kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó được xác định, trình tự nucleotit này của nó có thể thao tác được bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để thao tác trình tự nucleotit đó, ví dụ, kỹ thuật ADN tái tổ hợp, đột biến điểm trực tiếp, PCR, v.v. (lấy ví dụ, xem các kỹ thuật được mô tả trong: Sambrook et al., *Molecular Cloning, A Laboratory Manual*, 2d Ed., Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, N.Y. (1990) và Ausubel et al., eds., *Current Protocols in Molecular Biology*, John Wiley & Sons, NY (1998), cả hai tài liệu này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn), để tạo ra các kháng thể có trình tự axit amin khác biệt, lấy ví dụ để tạo ra các axit amin thay thế, loại bỏ và/hoặc chèn thêm.

IV. Biểu hiện polypeptit kháng thể

Việc thao tác tiếp đối với vật liệu di truyền được phân lập để tạo ra các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế, các polynucleotit mã hóa kháng thể này thường được chèn vào trong một vector biểu hiện để đưa vào các tế bào chủ mà các tế bào này có thể được sử dụng để sản xuất một lượng kháng thể mong muốn. Biểu hiện tái tổ hợp của kháng thể, hoặc mảnh, dẫn xuất hoặc thể tương đồng của nó, ví dụ, chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể liên kết với phân tử đích là được mô tả theo sáng chế. Một khi polynucleotit mã hóa phân tử kháng thể hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể, hoặc phần của nó (tốt hơn là chứa vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ) theo sáng chế có thể thu được, vector để sản xuất phân tử kháng thể có thể được tạo ra bởi kỹ thuật ADN tái tổ hợp bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Vì vậy, các phương pháp điều chế protein bởi biểu hiện polynucleotit có chứa trình tự nucleotit mã hóa kháng thể là được mô tả theo sáng chế. Các phương pháp này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sử dụng để xây dựng các vector biểu hiện có chứa trình tự mã hóa kháng thể đó và tín hiệu điều khiển phiên mã và dịch mã thích hợp. Các phương pháp này bao gồm, lấy ví dụ, kỹ thuật ADN tái tổ hợp *in vitro*, kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp gen *in vivo*. Vì vậy, sáng chế đề cập đến các vector tái bản có chứa trình tự nucleotit mã hóa phân tử kháng thể theo sáng chế, hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của chúng, hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ, được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự khởi đầu phiên mã. Các vector này có thể chứa trình tự nucleotit mã hóa vùng hằng định của phân tử kháng thể (ví dụ, xem: công bố đơn quốc tế WO 86/05807 và WO 89/01036; và US 5.122.464) và vùng biến đổi của kháng thể có thể được nhân dòng trong vector đó để biểu hiện toàn vẹn chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ đó.

Thuật ngữ "vector" hoặc "vector biểu hiện" được sử dụng theo sáng chế chỉ các vector được sử dụng theo sáng chế như phương tiện đưa vào và biểu hiện gen mong muốn trong tế bào chủ. Như đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, vector như vậy có thể dễ dàng được chọn từ nhóm bao gồm các plasmit, các thực khuẩn thể, các virus và các retrovirus. Nói chung, các vector thích hợp theo sáng chế có chứa một dấu chuẩn chọn lọc, vị trí giới hạn thích hợp để dễ dàng nhân dòng gen mong muốn và có khả năng đưa vào và/hoặc tái bản trong tế bào nhân

thực hoặc tế bào nhân sơ. Với mục đích này của sáng chế, có nhiều hệ vector biểu hiện có thể được sử dụng. Lấy ví dụ, một loại vector sử dụng các thành phần ADN có nguồn gốc từ virus động vật như là papilloma virus của bò, polyoma virus, adenovirus, vaccinia virus, baculovirus, retrovirus (RSV, MMTV hoặc MOMLV) hoặc virus SV40. Các hệ vector khác liên quan đến việc sử dụng hệ thống polycistronic với vị trí liên kết ribosom nội phân tử. Ngoài ra, các tế bào dung hợp ADN vào nhiễm sắc thể của chúng có thể được sàng lọc bằng cách đưa vào một hoặc nhiều dấu chuẩn cho phép chọn lọc các tế bào chủ chuyển gen. Dấu chuẩn này có thể đưa ra thể nguyên dưỡng với vật chủ khuyết dưỡng, kháng bioxit (ví dụ, chất kháng sinh) hoặc kháng kim loại nặng như là đồng. Gen dấu chuẩn chọn lọc này có thể được liên kết trực tiếp với các trình tự ADN để biểu hiện hoặc đưa vào cùng tế bào bằng cách đồng biến nạp. Các thành phần bổ sung cũng có thể cần thiết để tổng hợp mRNA tối ưu. Các thành phần này có thể chứa các trình tự tín hiệu, tín hiệu ghép nối, cũng như trình tự khởi đầu phiên mã, trình tự tăng cường và tín hiệu kết thúc.

Trong các phương án ưu tiên, các gen vùng biến đổi được nhân dòng được chèn vào vector biểu hiện cùng với gen vùng hằng định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (tốt hơn là của người) như đã đề cập ở trên. Theo một phương án, điều này có thể thực hiện được bằng cách sử dụng vector biểu hiện độc quyền của hãng Biogen IDEC, Inc., có tên thương mại là NEOSPLA, được bộc lộ trong US 6.159.730. Vector này có chứa một trình tự khởi đầu phiên mã/trình tự tăng cường của cytomegalovirus, trình tự khởi đầu phiên mã chính của beta globin của chuột, điểm khởi đầu tái bản SV40, trình tự hormon sinh trưởng được polyadenyl hóa, các exon 1 và exon 2 của neomycin phosphotransferaza, gen dihydrofolat reductaza và trình tự dẫn. Vector này cho thấy mức biểu hiện kháng thể cao khi kết hợp các gen của vùng hằng định và vùng biến đổi, chuyển nhiễm vào tế bào tế bào CHO, tiếp đó chọn lọc trong môi trường chứa G418 và khuếch đại methotrexat. Tất nhiên là, vector biểu hiện bất kỳ có khả năng tạo ra biểu hiện trong tế bào nhân thực có thể được sử dụng trong sáng chế. Ví dụ về các vector thích hợp bao gồm, nhưng không hạn chế ở các plasmit pcDNA3, pHCMV/Zeo, pCR3.1, pEF1/His, pIND/GS, pRc/HCMV2, pSV40/Zeo2, pTRACER-HCMV, pUB6/V5-His, pVAX1, và pZeoSV2 (được bán tại Invitrogen, San Diego, CA), và plasmit pCI (được bán tại Promega, Madison, WI). Nói chung, số lượng sàng lọc lớn tế bào được biến nạp mà có mức biểu hiện cao thích hợp nếu chuỗi nặng và chuỗi nhẹ

của globulin miễn dịch có thể thực hiện được bằng các thử nghiệm thông thường, lấy ví dụ, bằng hệ thống máy móc. Các hệ vectơ này cũng được đề cập trong US 5.736.137 và US 5.658.570, mỗi tài liệu trong số các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Hệ này cho phép biểu hiện với các mức cao, ví dụ, > 30pg/tế bào/ngày. Hệ vectơ mô hình khác đã được bộc lộ ví dụ, trong US 6.413.777.

Trong các phương án ưu tiên khác, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được biểu hiện bằng cách sử dụng các cấu trúc polycistronic như là các cấu trúc đã được bộc lộ trong US 2003-0157641 A1 và được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Trong các hệ biểu hiện này, nhiều sản phẩm gen quan tâm như là chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể có thể được tạo ra bởi cấu trúc polycistronic đơn lẻ. Các hệ này sử dụng một cách lợi thế vị trí tiếp nhận ribosom nội phân tử (IRES) để cho các mức biểu hiện kháng thể tương đối cao. Các trình tự IRES thích hợp đã được bộc lộ trong, ví dụ US 6.193.980 cũng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ đánh giá được là các hệ biểu hiện nào có thể được sử dụng một cách có hiệu quả để tạo ra toàn bộ các loại kháng thể được bộc lộ theo sáng chế.

Một cách chung hơn, một khi vectơ hoặc trình tự ADN mã hóa tiểu đơn vị của kháng thể đơn thể đã được chuẩn bị, vectơ biểu hiện này có thể được đưa vào trong tế bào chủ thích hợp. Việc đưa plasmit vào trong tế bào chủ có thể được thực hiện theo nhiều kỹ thuật đã biết mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể thực hiện. Các kỹ thuật này bao gồm, nhưng không hạn chế ở, việc chuyển nhiễm bao gồm sử dụng phương pháp chuyển nhiễm lipo, ví dụ, fugen hoặc lipofectamin, dung hợp nguyên bào, kết tủa canxi phosphat, dung hợp tế bào với ADN được bao, vi tiêm, và chuyển nhiễm với virus. Thông thường, việc đưa plasmit vào tế bào chủ thường bằng phương pháp chuẩn đồng kết tủa canxi phosphat. Tế bào chủ có cấu trúc biểu hiện này được sinh trưởng trong các điều kiện thích hợp để tổng hợp các chuỗi nặng và các chuỗi nhẹ, và phân tích sự tổng hợp chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Các kỹ thuật phân tích chuẩn như phương pháp phân tích hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), phân tích miễn dịch phóng xạ (RIA), hoặc phân tích hấp thụ tế bào hoạt hóa huỳnh quang (FACS), hóa miễn dịch tế bào và các phương pháp phân tích tương tự.

Vectơ biểu hiện được chuyển vào tế bào chủ bằng các kỹ thuật thông thường và tiếp đó nuôi cấy tế bào chuyển nhiễm bằng kỹ thuật thông dụng để tạo kháng thể để sử dụng trong các phương pháp được mô tả theo sáng chế. Vì vậy, sáng chế đề cập đến các tế bào chủ có chứa polynucleotit mã hóa kháng thể theo sáng chế, hoặc chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của nó, được liên kết một cách có kiểm soát với trình tự khởi đầu phiên mã ngoại lai. Trong các phương án ưu tiên để biểu hiện kháng thể chuỗi đôi, các vectơ mã hóa cả hai chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này có thể được đồng biểu hiện trong tế bào chủ để biểu hiện phân tử globulin miễn dịch toàn vẹn, như chi tiết hóa dưới đây.

Tế bào chủ này có thể được đồng chuyển nhiễm với hai vectơ biểu hiện theo sáng chế, vectơ thứ nhất mã hóa chuỗi nặng có nguồn gốc từ polypeptit và vectơ thứ hai mã hóa chuỗi nhẹ có nguồn gốc từ polypeptit. Hai vectơ này có thể chứa các dấu có thể chọn lọc giống nhau mà có khả năng biểu hiện đồng thời polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ như nhau. Theo các phương án thay thế, một vectơ đơn lẻ có thể được sử dụng mà vectơ này mã hóa cả hai polypeptit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Trong trường hợp này, chuỗi nhẹ tốt hơn là được đặt trước chuỗi nặng để tránh tăng quá mức chuỗi nặng có độc tính tự do; xem: Proudfoot, Nature 322 (1986), 52; Kohler, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 2197. Các trình tự mã hóa cho chuỗi nặng và chuỗi nhẹ này có thể chứa cDNA hoặc ADN hệ gen.

Theo sáng chế, "tế bào chủ" chỉ các tế bào mà chứa các vectơ được xây dựng bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp và mã hóa ít nhất một gen ngoại lai. Trong quá trình phân lập các kháng thể từ các tế bào chủ tái tổ hợp, thuật ngữ "tế bào" và "môi trường nuôi cấy tế bào" được sử dụng thay thế cho nhau chỉ nguồn kháng thể trừ khi được chỉ ra với nghĩa cụ thể rõ ràng khác. Nói cách khác, việc thu hồi polypeptit từ "tế bào" có thể mang nghĩa hoặc là từ toàn bộ tế bào chìm ở dưới, hoặc từ môi trường nuôi cấy tế bào cả trong môi trường và trong các tế bào được tạo huyền phù.

Có nhiều hệ vectơ biểu hiện vật chủ có thể được ứng dụng để biểu hiện các phân tử kháng thể để sử dụng trong các phương pháp được mô tả theo sáng chế. Các hệ biểu hiện tế bào chủ như vậy là phương tiện biểu hiện mà các trình tự mã hóa quan tâm có thể được sản sinh ra và tiếp đó là tinh sạch, nhưng cũng có mặt các tế bào mà tế bào này có thể được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với các trình tự nucleotit mã hóa thích hợp, biểu hiện phân tử kháng thể *in situ* theo sáng chế. Các tế bào này bao gồm, nhưng

không hạn chế ở, vi sinh vật như là vi khuẩn (ví dụ, *E. coli*, *B. subtilis*) được biến nạp với các vector biểu hiện ADN bacteriophage tái tổ hợp, ADN plasmit hoặc ADN cosmit có chứa các trình tự mã hóa kháng thể đó; nấm men (ví dụ, *Saccharomyces*, *Pichia*) được biến nạp với các vector biểu hiện tái tổ hợp nấm men có chứa các trình tự mã hóa kháng thể đó; các hệ tế bào côn trùng được lây nhiễm các vector biểu hiện tái tổ hợp của virus (ví dụ, baculovirus) có chứa các trình tự mã hóa; các hệ tế bào thực vật được lây nhiễm với các vector biểu hiện tái tổ hợp của virus (ví dụ, virus khảm súp lơ, CaMV; virus khảm thuốc lá, TMV) hoặc được biến nạp với các vector biểu hiện plasmit tái tổ hợp (ví dụ, Ti plasmit) có chứa các trình tự mã hóa kháng thể; hoặc các hệ tế bào động vật có vú (ví dụ, tế bào COS, CHO, NSO, BLK, 293, 3T3) có các cấu trúc biểu hiện chứa các trình tự khởi đầu phiên mã có nguồn gốc từ hệ gen của tế bào động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu phiên mã metallothionein) hoặc từ virus động vật có vú (ví dụ, trình tự khởi đầu phiên mã muộn của adenovirus; trình tự khởi đầu phiên mã của virus vaccinia7.5K). Tốt hơn là, đó là các tế bào vi khuẩn như là *Escherichia coli*, và tốt hơn nữa là, đó là tế bào nhân thực, đặc biệt tốt là để biểu hiện toàn vẹn phân tử kháng thể tái tổ hợp, được sử dụng để biểu hiện phân tử kháng thể tái tổ hợp. Lấy ví dụ, các tế bào động vật có vú như là các tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO: Chinese Hamster Ovary) kết hợp với vector như là thành phần trình tự khởi đầu phiên mã gen sớm trung gian chính từ cytomegalovirus là một hệ thống biểu hiện kháng thể hiệu quả; ví dụ, xem: Foecking et al., Gene 45 (1986), 101; Cockett et al., Bio/Technology 8 (1990), 2.

Dòng tế bào chủ được sử dụng để biểu hiện protein thường có nguồn gốc từ động vật có vú; người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này được cho là có khả năng xác định ưu tiên dòng các tế bào chủ cụ thể thích hợp nhất để sản phẩm gen mong muốn được biểu hiện trong đó. Các dòng tế bào mẫu bao gồm, nhưng không hạn chế ở, CHO (Chinese Hamster Ovary), DG44 và DUXB11 (dòng tế bào trứng chuột đồng Trung Quốc, trừ DHFR), HELA (dòng tế bào ung thư biểu mô cổ người), CVI (dòng tế bào thận khỉ), COS (dẫn xuất của CVI với kháng nguyên SV40 T), VERY, BHK (thận chuột con), MDCK, WI38, R1610 (nguyên bào sợi chuột Trung Quốc) BALBC/3T3 (nguyên bào sợi của chuột), HAK (dòng thận chuột), SP2/O (tế bào u tủy của chuột), P3x63-Ag3.653 (tế bào u tủy của chuột), BFA-1c1BPT (tế bào màng trong của bò), RAJI (tế bào lympho của người) và 293 (thận người). Các tế bào CHO và 293

được ưu tiên cụ thể. Các dòng tế bào chủ có thể mua ngoài thị trường, từ ATCC (ATCC: American Tissue Culture Collection) hoặc từ các ấn phẩm đã công bố.

Ngoài ra, dòng tế bào chủ có thể được lựa chọn từ dòng điều hòa biểu hiện trình tự chèn vào, hoặc cải biến và xử lý sản phẩm gen thành dạng đặc biệt mong muốn. Những cải biến như vậy (ví dụ, glycosyl hóa) và xử lý (ví dụ, phân cắt) các sản phẩm protein là rất quan trọng để thể hiện chức năng của protein đó. Các tế bào chủ khác nhau có các đặc tính và các cơ chế đặc biệt đối với việc xử lý sau dịch mã và cải biến protein và sản phẩm gen. Các dòng tế bào thích hợp hoặc các hệ tế bào chủ có thể được chọn để đảm bảo cải biến và xử lý đúng biểu hiện của protein ngoại lai. Cuối cùng, các tế bào chủ nhân thực có bộ máy tế bào cho quá trình xử lý thích hợp đối với phiên mã sơ cấp, glycosyl hóa, và phosphoryl hóa sản phẩm gen có thể được sử dụng.

Sản phẩm của protein tái tổ hợp có năng suất cao, biểu hiện ổn định về lâu dài được ưu tiên. Lấy ví dụ, các dòng tế bào mà biểu hiện ổn định phân tử kháng thể đó có thể được thiết kế. Việc sử dụng các vectơ biểu hiện khác có chứa điểm khởi đầu tái bản của virus, các tế bào chủ có thể được biến nạp với ADN được điều khiển bởi các thành phần điều khiển biểu hiện thích hợp (ví dụ, trình tự khởi đầu phiên mã, trình tự tăng cường, trình tự điểm kết thúc phiên mã, các vị trí polyadenyl hóa, v.v.), và một dấu chuẩn có thể chọn lọc. Sau khi đưa ADN ngoại lai, tế bào thiết kế này có thể được nuôi cấy phát triển từ 1-2 ngày trong môi trường làm giàu, và tiếp đó chuyển sang môi trường chọn lọc. Dấu chuẩn có thể chọn lọc này trong plasmit tái tổ hợp biểu hiện kháng lại sự chọn lọc và cho phép các tế bào cài nhập ổn định plasmit vào nhiễm sắc thể của chúng và phát triển thành dạng có thể quan sát để sau đó có thể được nhân dòng và nhân lên thành các dòng tế bào. Phương pháp này là thích hợp dùng để thiết kế các dòng tế bào có biểu hiện ổn định phân tử kháng thể.

Có nhiều hệ chọn lọc có thể được sử dụng, bao gồm nhưng không giới hạn ở các gen thymidin kinaza của virus rộp da (Wigler et al., Cell 11 (1977), 223), hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48 (1992), 202), và adenin phosphoribosyltransferaza (Lowy et al., Cell 22 (1980), 817) có thể sử dụng trong các tế bào tk, hgprt hoặc aprt, tương ứng. Tương tự, sự kháng lại chất chuyển hóa có thể được sử dụng như cơ sở chọn lọc các gen sau: dhfr, gen này kháng methotrexat (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980), 357; O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 1527); gpt, gen này kháng axit

mycophenolic (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78 (1981), 2072); neo, gen này kháng aminoglycosit G-418 Goldspiel et al., Clinical Pharmacy 12 (1993), 488-505; Wu and Wu, Biotherapy 3 (1991), 87-95; Tolstoshev, Ann. Rev. Pharmacol. Toxicol. 32 (1993), 573-596; Mulligan, Science 260 (1993), 926-932; và Morgan and Anderson, Ann. Rev. Biochem. 62 (1993), 191-217; TIB TECH 11 (1993), 155-215; và hygromycin (Santerre et al., Gene 30 (1984), 147. Các phương pháp thông dụng của kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này mà có thể được sử dụng được mô tả trong Ausubel et al. (eds.), Current Protocols in Molecular Biology, John Wiley & Sons, NY (1993); Kriegler, Gene Transfer and Expression, A Laboratory Manual, Stockton Press, NY (1990); và trong Chapters 12 and 13, Dracopoli et al. (eds), Current Protocols in Human Genetics, John Wiley & Sons, NY (1994); Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150:1 (1981), được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các mức biểu hiện phân tử kháng thể có thể được tăng lên bởi sự khuếch đại vector, về tổng quan, xem: Bebbington and Hentschel, The use of vectors based on gene amplification for the expression of cloned genes in mammalian cells in DNA cloning, Academic Press, New York, Vol. 3. (1987). Khi một dấu chuẩn trong hệ vector biểu hiện kháng thể được khuếch đại thì việc tăng mức chất ức chế trong môi trường nuôi cấy tế bào chủ làm tăng số lượng bản sao của gen dấu chuẩn. Do vùng khuếch đại có liên quan đến gen kháng thể nên sản phẩm kháng thể đó cũng được tăng lên; xem: Crouse et al., Mol. Cell. Biol. 3 (1983), 257.

Sản xuất *in vitro* cho phép sản xuất quy mô lớn lượng polypeptit mong muốn. Các kỹ thuật đối với việc nuôi cấy tế bào động vật có vú trong các điều kiện nuôi cấy mô là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm môi trường nuôi cấy huyền phù đồng nhất, ví dụ trong hệ thống lên men có sục khí hoặc trong hệ thống lên men có khuấy liên tục, hoặc môi trường nuôi cấy tế bào cố định hoặc môi trường giọt treo, ví dụ trong sợi rỗng, vi nang, trên vi hạt aga hoặc mặt gốm. Nếu cần và/hoặc nếu muốn, các dung dịch polypeptit có thể được tinh sạch bằng kỹ thuật sắc ký thông thường, lấy ví dụ lọc gel, sắc ký trao đổi ion, sắc ký qua DEAE-celluloza hoặc sắc ký ái lực (miễn dịch), ví dụ, sau khi sinh tổng hợp ưu tiên polypeptit vùng bản lề được tinh sạch hoặc trước hoặc sau bước sắc ký HIC như được mô tả theo sáng chế.

Gen mã hóa các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế cũng có thể được biểu hiện trong tế bào không phải là tế bào động vật có vú như tế bào vi khuẩn hoặc côn trùng hoặc nấm men hoặc tế bào thực vật. Vi khuẩn dễ dàng nhận các axit nucleic bao gồm các thành viên của họ Enterobacteriaceae, như loài *Escherichia coli* hoặc *Salmonella*; vi khuẩn họ Bacillus, như là *Bacillus subtilis*; *Pneumococcus*; *Streptococcus*, và *Haemophilus influenzae*. Sẽ đánh giá rằng, khi biểu hiện trong vi khuẩn, các polypeptit ngoại lai thường là một phần của thể vùi. Các polypeptit ngoại lai có thể phải phân lập, tinh chế, và tiếp đó lắp ghép thành các phân tử chức năng. Khi các kháng thể mong muốn ở dạng hóa trị bốn, các tiểu đơn vị khi đó sẽ được tự lắp ghép thành các kháng thể hóa trị bốn; ví dụ, xem: công bố đơn quốc tế WO02/096948.

Trong các hệ vi khuẩn, các vector biểu hiện thích hợp được chọn dựa trên mục đích sử dụng đối với phân tử kháng thể mong muốn được biểu hiện. Lấy ví dụ, khi một lượng lớn protein được tạo ra, để tạo thành các dược phẩm của phân tử kháng thể, thì các vector biểu hiện trực tiếp các sản phẩm protein dung hợp với mức cao mà dễ dàng tinh sạch là mong muốn. Các vector như vậy bao gồm, nhưng không hạn chế ở, vector biểu hiện pUR278 của *E.coli* (Ruther et al., EMBO J. 2 (1983), 1791), trong đó trình tự mã hóa kháng thể này có thể được gắn đơn lẻ vào vector đó đúng khung với vùng mã hóa gen lacZ sao cho protein dung hợp được tạo ra; các vector pIN (Inouye & Inouye, Nucleic Acids Res. 13 (1985), 3101-3109; Van Heeke & Schuster, J. Biol. Chem. 24 (1989), 5503-5509); và các vector tương tự. Các vector pGEX cũng có thể được sử dụng để biểu hiện các polypeptit ngoại lai như protein dung hợp với glutathion S-transferaza (GST). Nói chung, những protein dung hợp như vậy là protein hòa tan và dễ dàng tinh sạch từ dịch dung giải tế bào bằng cách hấp thụ và liên kết với chất nền là các hạt glutathion-agarosa sau đó được rửa giải với glutathion tự do. Các vector pGEX được thiết kế chứa thrombin hoặc vị trí phân cắt proteaza yếu tố Xa sao cho sản phẩm gen đích nhân dòng có thể tách ra khỏi gốc GST.

Ngoài vi sinh vật nhân sơ, các vi sinh vật nhân thực có thể được sử dụng. *Saccharomyces cerevisiae*, hoặc nấm men của bánh mỳ thông thường, là thường được sử dụng phổ biến nhất trong số các vi sinh vật nhân thực mặc dù có nhiều chủng khác nhau đã được bán phổ biến trên thị trường, ví dụ, *Pichia pastoris*. Để biểu hiện trong *Saccharomyces*, lấy ví dụ, plasmit YRp7, (Stinchcomb et al., Nature 282 (1979), 39;

Kingsman et al., Gene 7 (1979), 141; Tschemper et al., Gene 10 (1980), 157) thường được sử dụng. Plasmid này chứa sẵn gen TRP1 cung cấp dấu chuẩn chọn lọc đối với chủng nấm men đột biến không có khả năng phát triển trong tryptophan, lấy ví dụ ATCC No. 44076 hoặc PEP4-1 (Jones, Genetics 85 (1977), 12). Sau đó, sự tổn thương gen trp1 như đặc tính trong hệ gen của tế bào chủ nấm men cung cấp môi trường hiệu quả để phát hiện biến nạp bằng cách cho sinh trưởng trong môi trường thiếu tryptophan.

Trong hệ côn trùng thì virus nhân đa diện *Autographa californica* (AcNPV) thường được sử dụng như một vector biểu hiện gen ngoại lai. Virus này sinh trưởng trong các tế bào *Spodoptera frugiperda*. Trình tự mã hóa kháng thể này có thể được nhân dòng riêng rẽ và các vùng không thiết yếu (lấy ví dụ gen polyhedrin) của virus và đặt dưới sự điều khiển của trình tự khởi đầu phiên mã AcNPV (lấy ví dụ, trình tự khởi đầu phiên mã polyhedrin).

Một khi phân tử kháng thể theo sáng chế đã được biểu hiện tái tổ hợp, các kháng thể toàn vẹn, các thể dime của nó, từng chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, hoặc các dạng globulin miễn dịch khác theo sáng chế, có thể được tinh sạch theo các kỹ thuật chuẩn của lĩnh vực này, bao gồm, lấy ví dụ, bằng cách sắc ký (ví dụ, trao đổi ion, ái lực, cụ thể là ái lực liên kết với kháng nguyên đặc hiệu sau protein A và sắc ký cột theo kích thước), ly tâm, pha loãng với nồng độ khác nhau, ví dụ kết tủa với amoni sulfat, hoặc bằng các kỹ thuật chuẩn khác để tinh sạch các protein đó; ví dụ, xem: Scopes, "Protein Purification", Springer Verlag, N.Y. (1982). Trong các phương án thay thế, phương pháp được ưu tiên để tăng cường ái lực đối với các kháng thể theo sáng chế được bộc lộ trong US 2002-0123057 A1.

V. Protein dung hợp và thể tiếp hợp

Trong các phương án cụ thể, polypeptit kháng thể chứa trình tự axit amin, hoặc một hoặc nhiều gốc không kết hợp với kháng thể một cách bình thường. Các cải biến mẫu được mô tả chi tiết hơn ở dưới đây. Lấy ví dụ, mảnh kháng thể chuỗi đơn fv theo sáng chế có thể chứa một trình tự liên kết linh động, hoặc có thể được cải biến để bổ sung một gốc chức năng (ví dụ, PEG, thuốc, độc tố, hoặc chất đánh dấu như chất đánh dấu huỳnh quang, phóng xạ, enzym, lõi từ tính, kim loại nặng và các chất đánh dấu tương tự).

Một polypeptit kháng thể theo sáng chế có thể chứa, về cơ bản có chứa, hoặc bao gồm một protein dung hợp. Các protein dung hợp là các phân tử khảm có chứa, lấy ví dụ, vùng liên kết với α -synuclein của globulin miễn dịch với ít nhất một vị trí liên kết đích, và ít nhất một phần ngoại lai, nghĩa là, phần không được liên kết một cách tự nhiên trong tự nhiên. Các trình tự axit amin này có thể tồn tại trong các protein riêng rẽ mà liên kết cùng với nhau trong polypeptit dung hợp hoặc chúng có thể tồn tại một cách bình thường trong cùng một dạng protein đó nhưng sắp xếp khác trong polypeptit dung hợp. Protein dung hợp có thể được tạo ra, lấy ví dụ, bằng cách sinh tổng hợp hóa học, hoặc tạo ra và dịch mã polynucleotit mà trong đó các vùng peptit đó được mã hóa với mối liên hệ mong muốn.

Thuật ngữ "ngoại lai" được dùng cho polynucleotit hoặc polypeptit, có nghĩa là polynucleotit hoặc polypeptit nhận được từ dạng khác với dạng polynucleotit hoặc polypeptit của phần còn lại của dạng mà được so sánh với nó. Lấy ví dụ, theo sáng chế, một "polypeptit ngoại lai" được dung hợp với một kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc thể tương đồng của nó có nguồn gốc từ polypeptit không phải globulin miễn dịch cùng loài, hoặc globulin miễn dịch khác loài hoặc polypeptit không phải globulin miễn dịch khác loài.

Như đã được mô tả chi tiết trong phần mô tả này, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể còn được dung hợp tái tổ hợp với một polypeptit ngoại lai tại đầu C hoặc đầu N hoặc tiếp hợp hóa học (bao gồm tiếp hợp đồng hóa trị và phi đồng hóa trị) với các polypeptit hoặc các chế phẩm khác. Lấy ví dụ, các kháng thể có thể được dung hợp hoặc tiếp hợp tái tổ hợp với các phân tử hữu ích như là các chất đánh dấu trong phân tích phát hiện và phân tử phản ứng kích thích như là các polypeptit ngoại lai, thuốc, nucleotit phóng xạ, hoặc độc tố; ví dụ, xem: WO92/08495; WO91/14438; WO89/12624; US 5.314.995; và EP 0 396 387.

Các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể chứa các axit amin gắn với nhau bởi các liên kết peptit hoặc liên kết peptit được cải biến, nghĩa là, các đẳng vị peptit, và có thể chứa các axit amin khác ngoài 20 axit amin được mã hóa bởi gen. Các kháng thể này có thể được cải biến bằng các quy trình tự nhiên, như là quy trình xử lý sau dịch mã, hoặc bằng các kỹ thuật cải biến hóa học đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các cải biến

này được mô tả trong các sách giáo khoa phổ thông và chi tiết hơn là trong các công trình nghiên cứu chuyên sâu, cũng như trong các tạp chí nghiên cứu nhiều tập. Các cải biến này có thể xuất hiện bất kỳ trong kháng thể, bao gồm peptit xương sống, axit amin chuỗi bên và tại đầu amin hoặc carboxyl, hoặc trên các gốc như là carbohydrat. Có thể đánh giá được rằng cùng dạng cải biến có thể tạo ra một hoặc nhiều mức độ cải biến ở các vị trí khác nhau trong một kháng thể cụ thể. Tương tự, một kháng thể cụ thể có thể chứa nhiều loại cải biến. Kháng thể có thể được phân nhánh, lấy ví dụ, như là kết quả ubiquitin hóa, và chúng có thể được lặp lại, có thể phân nhánh có thể không. Các kháng thể lặp lại, phân nhánh, và phân nhánh lặp lại có thể do xử lý một cách tự nhiên sau dịch mã hoặc có thể được tạo ra bằng các phương pháp tổng hợp. Những cải biến này bao gồm axetyl hóa, axyl hóa, ADP-ribosyl hóa, amit hóa, gắn kết đồng hóa trị với flavin, gắn kết đồng hóa trị với một gốc heme, gắn kết đồng hóa trị với nucleotit hoặc dẫn xuất nucleotit, gắn kết đồng hóa trị với lipid hoặc dẫn xuất của lipid, gắn kết đồng hóa trị với phosphatidylinositol, liên kết chéo, lặp lại, hình thành liên kết disulfit, demethyl hóa, hình thành liên kết chéo đồng hóa trị, hình thành xystein, hình thành pyroglutamat, formyl hóa, gama-carboxyl hóa, glycosyl hóa, hình thành neo GPI, hydroxyl hóa, iot hóa, methyl hóa, myristoyl hóa, oxi hóa, pegyl hóa, quá trình thủy phân protein, phosphoryl hóa, prenyl hóa, racemit hóa, selenoyl hóa, sulfat hóa, bổ sung axit amin vào protein qua trung gian ARN vận chuyển-như arginyl hóa, và ubiquitin hóa; ví dụ, xem: Proteins - Structure And Molecular Properties, T. E. Creighton, W. H. Freeman and Company, New York 2nd Ed., (1993); Posttranslational Covalent Modification Of Proteins, B. C. Johnson, Ed., Academic Press, New York, pgs. 1-12 (1983); Seifter et al., Meth. Enzymol. 182 (1990), 626-646; Rattan et al., Ann. NY Acad. Sci. 663 (1992), 48-62).

Sáng chế cũng đề cập đến các protein dung hợp có chứa kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, và polypeptit ngoại lai. Theo một phương án, protein dung hợp theo sáng chế chứa, về cơ bản có chứa, hoặc bao gồm, polypeptit có trình tự axit amin của một hoặc nhiều vùng V_H bất kỳ của kháng thể theo sáng chế hoặc trình tự axit amin của một hoặc nhiều vùng V_L bất kỳ của kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh hoặc các biến thể của nó, và trình tự polypeptit ngoại lai. Theo một phương án khác, protein dung hợp để sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán và điều trị được mô tả theo sáng chế chứa, về cơ bản có chứa,

hoặc bao gồm polypeptit có trình tự axit amin của một, hai, ba V_H-CDR bất kỳ của kháng thể, hoặc các mảnh, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó, hoặc trình tự axit amin của một, hai, ba V_L-CDR bất kỳ của kháng thể, hoặc các mảnh, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó, và trình tự polypeptit ngoại lai. Theo một phương án, protein dung hợp có chứa polypeptit có trình tự axit amin V_H-CDR3 của kháng thể theo sáng chế, hoặc mảnh, dẫn xuất, hoặc biến thể của nó, và trình tự polypeptit ngoại lai, mà protein dung hợp đó liên kết một cách đặc hiệu với α -synuclein. Theo một phương án khác, protein dung hợp này có chứa một polypeptit có trình tự axit amin của ít nhất một vùng V_H của kháng thể theo sáng chế và trình tự axit amin của ít nhất một vùng V_L của kháng thể theo sáng chế hoặc các mảnh, các dẫn xuất hoặc các biến thể của nó, và một trình tự polypeptit ngoại lai. Tốt hơn là, vùng V_H và V_L của protein dung hợp tương ứng với kháng thể nguồn đơn lẻ (hoặc scFv hoặc mảnh Fab) mà liên kết một cách đặc hiệu với α -synuclein. Trong một phương án khác nữa, protein dung hợp để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán và điều trị được mô tả theo sáng chế bao gồm polypeptit có trình tự axit amin của một, hai, ba hoặc nhiều hơn của các V_H CDR của kháng thể, hoặc các mảnh hoặc các biến thể của nó, và trình tự polypeptit ngoại lai. Tốt hơn là, hai, ba, bốn, năm, sáu hoặc nhiều hơn V_H-CDR hoặc V_L-CDR tương ứng với kháng thể nguồn đơn lẻ (hoặc scFv hoặc mảnh Fab) theo sáng chế. Các phân tử axit nucleic mã hóa các protein dung hợp này cũng thuộc phạm vi của sáng chế.

Các protein dung hợp mẫu được báo cáo trong các ấn phẩm bao gồm các protein dung hợp của thụ thể tế bào T (Gascoigne et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 84 (1987), 2936-2940; CD4 (Capon et al., *Nature* 337 (1989), 525-531; Traunecker et al., *Nature* 339 (1989), 68-70; Zettmeissl et al., *DNA Cell Biol. USA* 9 (1990), 347-353; and Byrn et al., *Nature* 344 (1990), 667-670); L-selectin (homing receptor) (Watson et al., *J. Cell. Biol.* 110 (1990), 2221-2229; and Watson et al., *Nature* 349 (1991), 164-167); CD44 (Aruffo et al., *Cell* 61 (1990), 1303-1313); CD28 and B7 (Linsley et al., *J. Exp. Med.* 173 (1991), 721-730); CTLA-4 (Lisley et al., *J. Exp. Med.* 174 (1991), 561-569); CD22 (Stamenkovic et al., *Cell* 66 (1991), 1133-1144); TNF receptor (Ashkenazi et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 88 (1991), 10535-10539; Lesslauer et al., *Eur. J. Immunol.* 27 (1991), 2883-2886; and Peppel et al., *J. Exp. Med.* 174 (1991), 1483-1489 (1991); and IgE receptor α (Ridgway and Gorman, *J. Cell. Biol.* 115 (1991), Abstract No. 1448).

Như đã đề cập theo sáng chế, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được dung hợp với các polypeptit ngoại lai để tăng cường thời gian bán thải *in vivo* của các polypeptit này hoặc để sử dụng trong các phương pháp phân tích miễn dịch đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Lấy ví dụ, theo một phương án, PEG có thể được tiếp hợp với kháng thể theo sáng chế để tăng thời gian bán thải *in vivo* của nó; ví dụ, xem: Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106-119; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; hoặc Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

Hơn thế nữa, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được dung hợp với trình tự dấu chuẩn, như là peptit để dễ dàng tinh sạch hoặc loại bỏ chúng. Trong các phương án ưu tiên, trình tự axit amin dấu chuẩn này là peptit hexa-histidin (HIS), như là đuôi được cung cấp trong vector pQE (QIAGEN, Inc., 9259 Eton Avenue, Chatsworth, Calif., 91311), và các trình tự khác, một số trình tự trong số các trình tự này đã được thương mại hóa. Như được mô tả trong: Gentz et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 86 (1989), 821-824, lấy ví dụ, hexa-histidin tạo ra quá trình tinh sạch thông thường của protein dung hợp. Các peptit đuôi hữu ích khác để tinh sạch bao gồm, nhưng không hạn chế ở, đuôi "HA", mà peptit này thu được một cách tương ứng với epitop có nguồn gốc từ protein hemagglutinin của virus cúm (Wilson et al., Cell 37 (1984), 767) và đuôi "flag".

Các protein dung hợp có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này; lấy ví dụ, xem US 5.116.964 và US 5.225.538. Vị trí chính xác để thực hiện việc dung hợp này có thể được chọn theo kinh nghiệm để tối ưu hóa việc tiết ra hoặc tối ưu hóa tính chất liên kết của protein dung hợp. ADN mã hóa protein dung hợp tiếp đó được chuyển vào tế bào chủ để biểu hiện.

Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng ở dạng không tiếp hợp hoặc có thể tiếp hợp với ít nhất một trong số các phân tử, ví dụ, để tăng cường các tính chất điều trị bệnh của phân tử, dễ dàng phát hiện đích, hoặc để tạo hình ảnh hoặc điều trị bệnh cho bệnh nhân. Các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế có thể được đánh dấu hoặc tiếp hợp trước hoặc sau khi tinh sạch, khi mà quá trình tinh sạch được tiến hành. Cụ thể là, các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó

theo sáng chế có thể được tiếp hợp với các tác nhân trị liệu, các tiền dược chất, các peptit, các protein, các enzym, các virus, các lipid, các chất cải biến đáp ứng sinh học, các dược chất, hoặc PEG.

Các thể tiếp hợp mà là các độc tố miễn dịch bao gồm các kháng thể thông thường đã được mô tả rộng rãi trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các độc tố này có thể được bắt cặp với kháng thể bằng các kỹ thuật bắt cặp thông thường hoặc độc tố miễn dịch có chứa phần protein gây độc có thể được tạo ra như các protein dung hợp. Các kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng theo nhiều cách để thu được các độc tố miễn dịch như vậy. Minh họa cho các độc tố miễn dịch như vậy đã được mô tả bởi Byers, *Seminars Cell. Biol.* 2 (1991), 59-70 và bởi Fanger, *Immunol. Today* 12 (1991), 51-54.

Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này sẽ biết là các thể tiếp hợp có thể được lắp ghép bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật dựa trên tác nhân chọn lọc được tiếp hợp. Lấy ví dụ, các thể tiếp hợp với biotin được điều chế, ví dụ bằng cách phản ứng polypeptit liên kết với α -synuclein với este hoạt hóa biotin như là este biotin N-hydroxysuxinimit. Tương tự, các thể tiếp hợp với chất đánh dấu phát huỳnh quang có thể được tạo ra cùng với tác nhân bắt cặp, ví dụ các tác nhân được liệt kê theo sáng chế, hoặc bằng phản ứng với isothioxyanat, tốt hơn là fluorescein-isothioxyanat. Các thể tiếp hợp của các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế được điều chế theo cách tương tự.

Sáng chế còn gồm các kháng thể, hoặc các đoạn liên kết với kháng nguyên, các biến thể, hoặc các dẫn xuất của nó theo sáng chế tiếp hợp với tác nhân chẩn đoán hoặc điều trị. Các kháng thể này có thể được sử dụng để chẩn đoán, lấy ví dụ, chứng minh sự có mặt của bệnh thần kinh, chỉ ra nguy cơ mắc bệnh thần kinh, kiểm soát sự phát triển hoặc tiến triển của bệnh thần kinh, nghĩa là các bệnh có liên quan đến synuclein như một phần của quy trình xét nghiệm lâm sàng, ví dụ, xác định hiệu quả của việc điều trị và/hoặc chế độ ngăn ngừa. Việc phát hiện này có thể dễ dàng thực hiện bởi sự bắt cặp của kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó với cơ chất có thể phát hiện được. Các ví dụ về các cơ chất có thể phát hiện được bao gồm nhiều loại enzym, nhóm giả, vật liệu phát huỳnh quang, vật liệu phát quang, vật liệu phát quang sinh học, đồng vị phóng xạ, kim loại giải phóng positron bằng cách sử dụng các thiết bị tự ghi phát positron, và các ion kim loại thuận từ không phát xạ; ví dụ, xem: US 4.741.900 đối với các ion kim loại có thể tiếp hợp với các

kháng thể để sử dụng như các công cụ chẩn đoán theo sáng chế. Các ví dụ về các enzym thích hợp bao gồm peroxidaza cây cải ngựa, phosphataza kiềm, β -galactosidaza, hoặc axetylcholinesteraza; các ví dụ về các phức hợp nhóm giả phù hợp bao gồm streptavidin/biotin và avidin/biotin; các ví dụ về vật liệu phát huỳnh quang phù hợp bao gồm umbeliferon, fluorescein, fluorescein isothioxyanat, rhodamin, dichlorotriazinylamin fluorescein, dansyl clorit hoặc phycoerythrin; lấy ví dụ về vật liệu phát quang bao gồm luminol; các ví dụ về vật liệu phát quang sinh học bao gồm luxiferaza, luxiferin, và aequorin; và ví dụ về đồng vị phóng xạ phù hợp bao gồm ^{125}I , ^{131}I , ^{111}In hoặc ^{99}Tc .

Kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó cũng có thể được đánh dấu phát hiện bằng cách bắt cặp với hợp chất quang hóa. Sự có mặt kháng thể đích của chất quang hóa sau đó được xác định bằng cách phát hiện sự có mặt của ánh sáng sinh ra trong quá trình phản ứng hóa học. Các ví dụ về chất quang hóa cụ thể hữu ích như chất đánh dấu là luminol, isoluminol, theromatic acridinium este, imidazole, muối acridinium và oxalat este.

Một trong các cách mà kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó có thể được đánh dấu phát hiện là liên kết với cùng loại enzym và sử dụng sản phẩm liên kết đó trong phân tích miễn dịch enzym (EIA) (Voller, A., "The Enzyme Linked Immunosorbent Assay (ELISA)" Microbiological Associates Quarterly Publication, Walkersville, Md., Diagnostic Horizons 2 (1978), 1-7); Voller et al., J. Clin. Pathol. 31 (1978), 507-520; Butler, Meth. Enzymol. 73 (1981), 482-523; Maggio, E. (ed.), Enzyme Immunoassay, CRC Press, Boca Raton, Fla., (1980); Ishikawa, E. et al., (eds.), Enzyme Immunoassay, Kaku Shoin, Tokyo (1981). Enzym liên kết với kháng thể này sẽ phản ứng với cơ chất thích hợp, tốt hơn là chất sinh màu, theo cách mà tạo ra gốc hóa học có thể phát hiện được, lấy ví dụ, bằng quang phổ kế, flo kế hoặc bằng mắt. Các enzym mà có thể sử dụng để phát hiện kháng thể bao gồm, nhưng không hạn chế ở, malat dehydrogenaza, staphylococcal nucleaza, delta-5-steroid isomeraza, alcohol dehydrogenaza của nấm men, alpha-glyxerophosphat, dehydrogenaza, trioza phosphat isomeraza, peroxidaza cây cải ngựa, phosphataza kiềm, asparaginaza, glucoza oxidaza, beta-galactosidaza, ribonucleaza, ureaza, catalaza, glucos-6-phosphat dehydrogenaza, glucoamylaza và axetylcholinesteraza. Ngoài ra, việc phát hiện này có thể được thực hiện với các phương pháp đo màu mà sử

dụng như cơ chất là chất sinh màu đối với enzym đó. Việc phát hiện này cũng có thể được thực hiện bằng cách so sánh hình ảnh mức phản ứng enzym với cơ chất khi so sánh với các mẫu chuẩn được thực hiện tương tự.

Việc phát hiện cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp phân tích miễn dịch khác. Lấy ví dụ, bằng việc đánh dấu phóng xạ kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó, mà có khả năng phát hiện kháng thể đó thông qua sử dụng phương pháp phân tích miễn dịch phóng xạ (RIA) (lấy ví dụ, xem: Weintraub, B., *Principles of Radioimmunoassays, Seventh Training Course on Radioligand Assay Techniques*, The Endocrine Society, (March, 1986)) mà được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Chất đồng vị phóng xạ này có thể được phát hiện bằng các công cụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thiết bị đếm gama, thiết bị đếm phát xạ, hoặc thiết bị đo phóng xạ tự ghi.

Một kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó cũng có thể đánh dấu phát hiện được bằng các kim loại phát huỳnh quang như ^{152}Eu , hoặc các kim loại khác của nhóm lanthanit. Các kim loại này có thể được gắn vào kháng thể bằng cách sử dụng các nhóm cằng kim loại như axit diethylenetriaminepentaxetic (DTPA) hoặc axit ethylenediaminetetraaxetic (EDTA).

Các kỹ thuật tiếp hợp các gốc khác nhau với kháng thể, hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên, biến thể, hoặc dẫn xuất của nó là đã biết, ví dụ, xem: Arnon et al., "Monoclonal Antibodies For Immunotargeting Of Drugs In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies And Cancer Therapy*, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. (1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", in *Controlled Drug Delivery* (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), Marcel Dekker, Inc., pp. 623-53 (1987); Thorpe, "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", in *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); "Analysis, Results, And Future Prospective Of The Therapeutic Use Of Radiolabeled Antibody In Cancer Therapy", in *Monoclonal Antibodies For Cancer Detection And Therapy*, Baldwin et al. (eds.), Academic Press pp. 303-16 (1985), and Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.* 62 (1982), 119-158.

Như được đề cập ở trên, trong các phương án cụ thể, một gốc mà tăng cường tính ổn định hoặc tính hiệu quả của phân tử liên kết, ví dụ, polypeptit liên kết, kháng thể

hoặc mảnh miễn dịch đặc hiệu của nó có thể được tiếp hợp. Lấy ví dụ, theo một phương án, PEG có thể được tiếp hợp với các phân tử liên kết theo sáng chế để tăng cường thời gian bán thải của chúng *in vivo*. Leong et al., Cytokine 16 (2001), 106; Adv. in Drug Deliv. Rev. 54 (2002), 531; hoặc Weir et al., Biochem. Soc. Transactions 30 (2002), 512.

VI. Các chế phẩm và phương pháp sử dụng

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm có chứa phân tử liên kết với α -synuclein như đề cập ở trên, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế hoặc dẫn xuất hoặc biến thể của nó, hoặc polynucleotit, vectơ hoặc tế bào theo sáng chế. Chế phẩm theo sáng chế có thể chứa thêm một chất mang dược dụng. Hơn thế nữa, dược phẩm theo sáng chế có thể chứa thêm các tác nhân khác như là interleukin hoặc interferon tùy theo mục đích sử dụng dược phẩm. Lấy ví dụ, để điều trị bệnh Parkinson thì tác nhân bổ sung có thể được chọn từ nhóm bao gồm các phân tử hữu cơ nhỏ, các kháng thể kháng α -synuclein, và dạng kết hợp của nó. Do đó, theo một phương án ưu tiên cụ thể, sáng chế đề cập đến việc sử dụng phân tử liên kết với α -synuclein, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế hoặc phân tử liên kết về cơ bản có cùng tính đặc hiệu liên kết với dạng bất kỳ của nó, polynucleotit, vectơ hoặc tế bào theo sáng chế để điều chế dược phẩm hoặc chế phẩm chẩn đoán để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh liên quan đến synuclein, kiểm soát tiến trình của bệnh liên quan đến synuclein hoặc đáp ứng điều trị bệnh liên quan đến synuclein trong đối tượng hoặc để phát hiện đối tượng có nguy cơ mắc bệnh liên quan đến synuclein.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh rối loạn thần kinh mà đặc trưng ở chỗ tích lũy và/hoặc lắng tụ α -synuclein trong não và trong hệ thống thần kinh trung ương bất thường, một cách tương ứng, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng có nhu cầu sử dụng một lượng điều trị hữu hiệu của một chất bất kỳ trong số các phân tử liên kết với α -synuclein, các kháng thể, các polynucleotit, các vectơ hoặc các tế bào bất kỳ đã đề cập ở trên theo sáng chế. Thuật ngữ "rối loạn thần kinh" bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh liên quan đến synuclein như bệnh Parkinson (PD), mất trí bệnh Parkinson (PDD), mất trí với thể Lewy (DLB), các biến tướng thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD), teo cơ đa hệ thống (MSA), suy chức năng thần kinh tự chủ đơn thuần (PAF), thoái hóa thần kinh

với sự tích tụ sắt trong não typ 1 (NBIA-I), bệnh Alzheimer, bệnh Pick, đau cơ mô sợi trục thần kinh khởi phát vị thành niên (bệnh Hallervorden-Spatz), bệnh xơ cứng teo cơ một bên, chấn thương não, và hội chứng Down cũng như các bệnh và rối loạn cử động khác của hệ thần kinh trung ương (CNS) nói chung. Trừ khi được nêu với nghĩa khác, các thuật ngữ thoái hóa thần kinh, bệnh tâm thần hoặc bệnh thần kinh được sử dụng thay thế cho nhau.

Một thuận lợi cụ thể của cách tiếp cận trị liệu theo sáng chế dựa trên yếu tố là các kháng thể theo sáng chế có nguồn gốc từ các tế bào B hoặc các tế bào B nhớ từ những người cao tuổi không có biểu hiện bệnh Parkinson và vì vậy, có khả năng ngăn ngừa thực sự về mặt lâm sàng các bệnh liên quan đến synuclein, hoặc làm giảm nguy cơ xuất hiện bệnh này về mặt lâm sàng, hoặc trì hoãn sự tấn công hoặc tiến triển bệnh về mặt lâm sàng. Thông thường, các kháng thể theo sáng chế cũng có thể thu được một cách thành công thông qua sự trưởng thành của tế bào sôma, nghĩa là tối ưu hóa về mặt chọn lọc và hiệu quả với ái lực liên kết cao đối với phân tử α -synuclein bằng các cách biến đổi tế bào sôma trong các vùng biến đổi của kháng thể.

Kiến thức là các tế bào *in vivo* như vậy, ví dụ trong người, không được hoạt hóa bởi các cách liên quan đến các protein sinh lý hoặc các cấu trúc tế bào khác theo hướng phản ứng tự miễn hoặc phản ứng dị ứng, cũng rất quan trọng về mặt y học do điều này biểu thị một cơ hội tăng đáng kể việc cứu sống thành công bệnh nhân thông qua các giai đoạn thử nghiệm lâm sàng. Để khẳng định, tính hiệu quả, khả năng chấp nhận và tính dung nạp đã được chứng minh trước khi phát triển tiền lâm sàng và lâm sàng của kháng thể ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh trong ít nhất một đối tượng là người. Vì vậy, có thể mong đợi rằng các kháng thể kháng α -synuclein của người theo sáng chế, ở cả dạng có tác dụng đặc hiệu cấu trúc đích của nó như tác nhân trị liệu và khả năng giảm các tác dụng phụ của nó làm tăng một cách đáng kể khả năng thành công của nó trong điều trị lâm sàng.

Sáng chế cũng đề cập đến dược phẩm và chế phẩm chẩn đoán, một cách tương ứng, gói hoặc kit có chứa một hoặc nhiều vật mang chứa một hoặc nhiều thành phần được mô tả ở trên, ví dụ kháng thể kháng α -synuclein, mảnh liên kết, dẫn xuất hoặc biến thể của nó, polynucleotit, vector hoặc tế bào theo sáng chế. Liên quan đến (các) vật chứa như vậy có thể lưu ý ở dạng đã được chỉ định theo mẫu của cơ quan quản lý nhà nước điều hành việc sản xuất, sử dụng hoặc buôn bán các dược phẩm hoặc các sản

phẩm sinh học, mà nó đã được chấp nhận bởi cơ quan quản lý nhà nước về sản xuất sử dụng, buôn bán cho người sử dụng. Ngoài ra hoặc trong một phương án thay thế, kit này có chứa thuốc thử và/hoặc hướng dẫn sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán thích hợp. Chế phẩm, ví dụ kit theo sáng chế là hướng đặc biệt thích hợp để đánh giá, chẩn đoán, ngăn ngừa và điều trị nguy cơ mắc bệnh rối loạn cùng với sự xuất hiện của α -synuclein, và cụ thể là thích hợp để điều trị bệnh Parkinson (PD), mất trí với bệnh Parkinson (PDD), mất trí với thể Lewy (DLB) và biến tướng thể Lewy của bệnh Alzheimer (LBVAD).

Dược phẩm theo sáng chế có thể được phối trộn theo phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này; ví dụ, xem: Remington: The Science and Practice of Pharmacy (2000) by the University of Sciences in Philadelphia, ISBN 0-683-306472. Ví dụ về chất mang dược dụng thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm dung dịch đệm muối phosphat, nước, huyền phù, như huyền phù dầu/nước, nhiều loại tác nhân giữ ẩm, dung dịch vô trùng, v.v. Các chế phẩm chứa những chất mang như vậy có thể được phối trộn bằng các phương pháp thông thường đã biết. Các dược phẩm này có thể được sử dụng cho đối tượng với liều thích hợp. Việc sử dụng chế phẩm thích hợp có thể được thực hiện theo nhiều cách khác nhau, ví dụ, sử dụng trong tĩnh mạch, trong nội phúc mạc, dưới da, trong bắp, đường mũi, tại chỗ hoặc trong da hoặc phân phối vào cột sống hoặc não. Các chế phẩm sol khí như là các chế phẩm phun đường mũi bao gồm chất lỏng tinh khiết hoặc các dung dịch của các thành phần hoạt tính với các chất bảo quản và chất đồng đẳng tương. Các chế phẩm như vậy tốt hơn là được điều chỉnh độ pH và tình trạng đẳng trương thích hợp so với màng nhầy của mũi. Các chế phẩm để sử dụng trong trực tràng hoặc sử dụng trong âm đạo có thể ở dạng thuốc viên đạn với chất mang thích hợp.

Hơn thế nữa, sáng chế bao gồm quy trình chuẩn (may mắn là không thường xuyên) là khoan một lỗ nhỏ trên hộp sọ để đưa thuốc theo sáng chế vào, theo một khía cạnh ưu tiên, phân tử liên kết, cụ thể là kháng thể hoặc thuốc trên cơ sở kháng thể theo sáng chế có thể liên kết chéo với hàng rào máu não, điều này cho phép sử dụng theo đường miệng hoặc đường ruột.

Chế độ liều dùng sẽ được xác định bởi thầy thuốc và các yếu tố lâm sàng. Như đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, liều lượng đối với một bệnh nhân phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm thể trạng bệnh nhân, diện tích bề mặt cơ thể, độ tuổi, các thành phần

cụ thể được sử dụng, giới tính, thời gian và đường sử dụng, sức khỏe tổng thể, và thuốc khác được sử dụng cùng. Liều dùng thông thường có thể là, lấy ví dụ, trong khoảng 0,001 đến 1000 μ g (hoặc axit nucleic để biểu hiện hoặc để ức chế biểu hiện trong khoảng này); Tuy nhiên, liều dùng thấp và cao hơn khoảng ví dụ này vẫn được xét đến, cụ thể là khi xem xét đến các yếu tố nêu trên. Nói chung, liều dùng có thể nằm trong khoảng, ví dụ, từ khoảng 0,0001 đến 100mg/kg, và thường là từ 0,01 đến 5mg/kg (ví dụ, 0,02mg/kg, 0,25mg/kg, 0,5mg/kg, 0,75mg/kg, 1mg/kg, 2mg/kg, v.v.), theo trọng lượng cơ thể. Lấy ví dụ liều dùng có thể là 1mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc 10mg/kg trọng lượng cơ thể hoặc trong khoảng 1-10mg/kg, tốt hơn là ít nhất 1mg/kg. Các liều dùng trung gian trong khoảng trên cũng được dự định là nằm trong phạm vi của sáng chế. Các đối tượng có thể sử dụng như liều dùng hàng ngày, nhiều ngày, hàng tuần hoặc theo phác đồ bất kỳ khác được xác định bởi phân tích kinh nghiệm. Một ví dụ điều trị chuẩn đòi hỏi sử dụng đa liều với một khoảng thời gian dài, lấy ví dụ, ít nhất sáu tháng. Một chế độ điều trị bổ sung chuẩn đòi hỏi sử dụng một lần trong hai tuần hoặc một lần trong một tháng hoặc một lần trong 3 đến 6 tháng. Phác đồ liều dùng chuẩn bao gồm 1-10mg/kg hoặc 15mg/kg hàng ngày, 30mg/kg với nhiều ngày hoặc 60mg/kg hàng tuần. Trong một số phương pháp, hai hoặc nhiều kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu liên kết khác biệt được sử dụng một cách đồng thời, trong đó trường hợp liều dùng của kháng thể được sử dụng nằm trong khoảng được chỉ định. Tiến trình này có thể được đánh giá định kỳ. Các chế phẩm điều chế để sử dụng ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch nước vô trùng hoặc dung dịch vô trùng không phải nước, huyền phù, và nhũ tương. Các ví dụ về các dung môi không phải nước là propylen glycol, polyethylen glycol, dầu cải như là dầu ô liu, và các este hữu cơ có thể tiêm được như là ethyl oleat. Các chất mang chứa nước bao gồm nước, dung môi nước/rượu, nhũ tương hoặc huyền phù, bao gồm nước muối và dung dịch đệm. Các tá dược ngoài đường tiêu hóa bao gồm dung dịch natri clorua, dextroza của Ringer, dextroza và kali clorua, dầu Ringer được lactat hóa, hoặc các loại dầu cố định. Các tá dược tĩnh mạch bao gồm dịch thể và chất điện giải, chất điện phân (như là chất điện giải dựa trên dextroza của Ringer), và các chất tương tự. Các chất bảo quản và các chất phụ gia cũng có thể có mặt, lấy ví dụ, các chất kháng khuẩn, các chất chống oxy hóa, các chất tạo cang, và các khí trơ và các chất tương tự. Hơn thế nữa, dược phẩm

theo sáng chế có thể chứa thêm các tác nhân như là dopamin hoặc thuốc tâm thần, theo mục đích sử dụng của dược phẩm này.

Hơn thế nữa, theo một phương án ưu tiên theo sáng chế, chế phẩm có thể được phối trộn thành vaccin, lấy ví dụ, khi chế phẩm theo sáng chế chứa kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết, dẫn xuất hoặc biến thể của nó để gây miễn dịch thụ động. Như đề cập trong phần tình trạng kỹ thuật của sáng chế, các đoạn oligo của α -synuclein đã biết là dạng ngoại bào trong huyết thanh và CSF (El-Agnaf et al., FASEB J. 20 (2006), 419–425) và các nghiên cứu gây miễn dịch thụ động trên mẫu chuột bị mắc bệnh Parkinson cho thấy các kháng thể đơn dòng ngoại bào của chuột kháng α -synuclein có thể làm giảm sự kết tụ nội bào của α -synuclein (Masliah et al., Neuron, 46 (2005), 857–868). Do đó, thận trọng mong muốn rằng các kháng thể kháng α -synuclein của người và các phân tử liên kết với α -synuclein tương ứng theo sáng chế là đặc biệt hữu dụng như là vaccin để ngăn ngừa hoặc cải thiện bệnh liên quan đến synuclein như PD, DLB và LBVAD.

Theo một phương án, có thể có lợi khi sử dụng Fab tái tổ hợp (rFab) và các mảnh chuỗi đơn (scFvs) của kháng thể theo sáng chế, mà có thể thâm nhập dễ dàng hơn qua màng tế bào. Lấy ví dụ, Robert et al., Protein Eng. Des. Sel. (2008) Oct 16; S1741-0134, công bố trực tuyến mô tả việc sử dụng Fab kháng tái tổ hợp (rFab) và các mảnh chuỗi đơn (scFvs) của kháng thể đơn dòng WO-2 mà nhận biết vùng đầu N của A β . Các mảnh được thiết kế có thể (i) ngăn ngừa xơ hóa amyloid, (ii) không kết tụ sợi A β 1-42 tiền hình thành và (iii) ức chế độc tính gây độc thần kinh thông qua trung gian oligo A β 1-42 *in vitro* đủ hiệu quả như phân tử IgG toàn vẹn. Các lợi ích dự đoán được của việc sử dụng các dạng kháng thể được thiết kế dựa trên Fab và scFv nhỏ mà thiếu chức năng phản ứng kích thích bao gồm các phản ứng chéo hiệu quả hơn với rào cản máu não và tối thiểu hóa nguy cơ xảy ra phản ứng phụ gây viêm nhiễm. Hơn thế nữa, so với scFv và các kháng thể chuỗi đơn còn tính đặc hiệu liên kết của kháng thể có chiều dài đầy đủ, thì chúng có thể được biểu hiện như các gen đơn lẻ và trong nội bào của tế bào động vật có vú như các kháng thể nội bào, với khả năng thay đổi gấp nếp, các tương tác, các cải biến, hoặc khu trú tại các đích dưới tế bào của chúng; về tổng quan, ví dụ xem Miller và Messer, Molecular Therapy 12 (2005), 394–401.

Theo một cách tiếp cận khác, Muller et al., Expert Opin. Biol. Ther. (2005), 237-241, mô tả kỹ thuật nền, còn gọi là "kỹ thuật siêu kháng thể", kỹ thuật này cho phép

các kháng thể được di chuyển qua tế bào sống nhưng không làm hại nó. Những kháng thể thâm nhập tế bào này mở ra một hướng ngăn ngừa và điều trị bệnh. Thuật ngữ 'TransMabs' được đặt cho các kháng thể như vậy.

Trong một phương án khác, việc sử dụng đồng thời hoặc sử dụng kế tiếp các chất bảo vệ thần kinh hữu dụng để điều trị bệnh liên quan đến synuclein có thể được mong đợi. Theo một phương án, các chất độn dùng trong dược phẩm theo sáng chế. Ví dụ, các chất bảo vệ thần kinh có thể được sử dụng để điều trị cho đối tượng bao gồm, nhưng không hạn chế ở, chất ức chế axetylcholinesteraza, chất đối kháng thụ thể glutamatergic, các chất ức chế kinaza, các chất ức chế HDAC, các chất kháng viêm, natri divalproex, hoặc dạng kết hợp bất kỳ của nó. Các ví dụ về chất bảo vệ thần kinh có thể được sử dụng cùng với dược phẩm theo sáng chế được mô tả trong lĩnh vực kỹ thuật này; xem: ví dụ công bố đơn quốc tế WO2007/011907. Theo một phương án, chất độn này là chất chủ vận thụ thể dopamin hoặc dopamin.

Trong một phương án khác theo sáng chế các phân tử liên kết với α -synuclein, cụ thể là kháng thể theo sáng chế có thể được sử dụng đồng thời, trước hoặc sau khi điều trị cấy ghép thần kinh hoặc liệu pháp tế bào gốc hữu dụng để điều trị bệnh liên quan đến synuclein. Các tiếp cận với việc cấy chuyển phôi bào thần kinh não giữa cho các bệnh nhân bị mắc bệnh Parkinson với mục đích thay thế neuron bị mất do bệnh và khôi phục lại sự dẫn truyền thần kinh dopamin thể vân. Sau khi cấy ghép khoảng 11-16 năm, tế bào thần kinh ghép này cho thấy có chứa thể Lewy và sợi trục Lewy. Điều này làm lây lan bệnh liên quan đến α -synuclein từ vật chủ đến các mô ghép mà có thể ngăn chặn bằng cách sử dụng cùng với các phân tử liên kết với α -synuclein, cụ thể là kháng thể theo sáng chế.

Liều dùng hoặc lượng có tác dụng điều trị chỉ lượng thành phần hoạt tính đủ để cải thiện triệu chứng hoặc tình trạng bệnh. Hiệu quả trị liệu và độc tính của những hợp chất như vậy có thể được xác định bởi các quy trình chuẩn của dược phẩm trong các dịch nuôi cấy tế bào hoặc trên các động vật, ví dụ, ED₅₀ (liều dùng có hiệu quả điều trị 50% quần thể) và LD₅₀ (liều dùng gây chết 50% quần thể). Tỷ lệ liều dùng trong khoảng điều trị và gây độc là chỉ số điều trị, và có thể biểu hiện như tỷ lệ LD₅₀/ED₅₀. Tốt hơn là, chất trị liệu trong chế phẩm tồn tại với một lượng đủ để trở lại hoặc duy trì tập tính bình thường và/hoặc các tính chất về mặt nhận thức trong trường hợp PD, DLB hoặc các bệnh liên quan đến synuclein khác.

Như đã đề cập ở trên, nó là bằng chứng rằng sáng chế bao hàm việc sử dụng bất kỳ của phân tử liên kết với α -synuclein có chứa ít nhất một CDR của kháng thể đã mô tả ở trên, cụ thể là để chẩn đoán và/hoặc điều trị bệnh liên quan đến synuclein như đã đề cập ở trên, cụ thể là bệnh Parkinson. Tốt hơn là, phân tử liên kết này là kháng thể theo sáng chế hoặc chuỗi globulin miễn dịch của nó. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng idiotypic của kháng thể bất kỳ đã đề cập ở trên. Các kháng thể hoặc phân tử liên kết khác liên kết với trình tự peptit duy nhất có tính kháng nguyên nằm trên vùng biến đổi của kháng thể gần vị trí liên kết với kháng nguyên là hữu dụng, ví dụ, để phát hiện các kháng thể kháng α -synuclein trong mẫu của đối tượng.

Theo một phương án khác sáng chế đề cập đến chế phẩm chẩn đoán có chứa một dạng bất kỳ trong số các phân tử liên kết với α -synuclein, các kháng thể, các đoạn liên kết với kháng nguyên, các polynucleotit, các vectơ hoặc các tế bào theo sáng chế và các cách thích hợp không bắt buộc để chẩn đoán như các thuốc thử thường sử dụng trong các phương pháp chẩn đoán dựa trên miễn dịch hoặc axit nucleic. Các kháng thể theo sáng chế, lấy ví dụ, là thích hợp để sử dụng trong các phân tích miễn dịch, trong đó chúng có thể được sử dụng trong pha lỏng hoặc liên kết với chất mang pha rắn. Các ví dụ về các phương pháp phân tích miễn dịch có thể sử dụng kháng thể theo sáng chế là phương pháp phân tích miễn dịch cạnh tranh hoặc không cạnh tranh với định dạng gián tiếp hoặc là trực tiếp. Các ví dụ về các phương pháp phân tích miễn dịch như vậy là phân tích miễn dịch phóng xạ (RIA), phân tích miễn dịch dạng bánh kẹp, đo dòng chảy tế bào và phân tích thẩm tách Western. Các kháng nguyên và các kháng thể theo sáng chế có thể liên kết với nhiều chất mang khác nhau và được sử dụng để phân lập các tế bào liên kết đặc hiệu với chúng. Các ví dụ về các chất mang đã biết bao gồm thủy tinh, polystyren, polyvinyl clorua, polypropylen, polyethylen, polycarbonat, dextran, nylon, amyloza, xeluloza tự nhiên hoặc cải biến, polyacrylamit, agarosa, và oxit sắt từ. Bản chất chất mang có thể hòa tan hoặc không hòa tan theo mục đích sáng chế. Có nhiều chất đánh dấu và phương pháp đánh dấu là đã biết đối với người có kỹ năng trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các ví dụ loại chất đánh dấu này có thể được sử dụng theo sáng chế bao gồm các enzym, các đồng vị phóng xạ, các kim loại keo, các hợp chất phát huỳnh quang, các hợp chất quang hóa, và các hợp chất phát quang sinh học; cũng là các phương án được đề cập theo sáng chế.

Theo các phương án ưu tiên khác, các phân tử liên kết với α -synuclein, cụ thể là các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong phương pháp chẩn đoán bệnh rối loạn của cá thể bởi mẫu dịch từ cá thể xét nghiệm đó mà mẫu này có thể là mẫu máu, mẫu bạch huyết hoặc các dạng mẫu dịch khác của cơ thể và tiếp xúc mẫu dịch đó với kháng thể theo sáng chế trong các điều kiện có thể hình thành phức hợp kháng nguyên-kháng thể. Mức các phức hợp này tiếp đó được xác định bởi các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, một mức cao hơn đáng kể mức trong mẫu đối chứng chỉ ra rằng cá thể xét nghiệm đó có bệnh. Theo cách tương tự, kháng nguyên đặc hiệu liên kết với các kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng. Vì vậy, sáng chế đề cập đến phương pháp phân tích miễn dịch *in vitro* có chứa phân tử liên kết, ví dụ, kháng thể hoặc đoạn liên kết với kháng nguyên của nó theo sáng chế.

Theo ngữ cảnh này, sáng chế cũng đề cập đến công cụ được thiết kế đặc biệt cho mục đích này. Lấy ví dụ, mảng dựa trên cơ sở kháng thể có thể được sử dụng, lấy ví dụ, mảng này được nạp các kháng thể hoặc các phân tử liên kết với kháng nguyên theo sáng chế có khả năng nhận biết một cách đặc hiệu α -synuclein. Việc thiết kế mảng phân tích miễn dịch được nêu tổng quan trong Kusnezow và cộng sự, *Mol. Cell Proteomics* 5 (2006), 1681-1696. Do đó, sáng chế cũng đề cập đến vi mảng được nạp các phân tử liên kết đặc hiệu với α -synuclein được nhận biết theo sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp chẩn đoán bệnh liên quan đến synuclein trong đối tượng, phương pháp này bao gồm:

- (a) đánh giá mức α -synuclein trong mẫu thu được từ đối tượng được chẩn đoán với kháng thể theo sáng chế, mảnh liên kết với α -synuclein của nó hoặc phân tử liên kết với α -synuclein về cơ bản là có cùng các tính đặc hiệu liên kết với một dạng bất kỳ của nó; và
- (b) so sánh mức α -synuclein với mức chuẩn tham chiếu để chỉ ra mức α -synuclein trong một hoặc nhiều đối tượng kiểm soát, trong đó mức α -synuclein khác hoặc tương tự với mức chuẩn tham chiếu sẽ chỉ ra đối tượng đó bị mắc bệnh Parkinson.

Đối tượng được chẩn đoán có thể có triệu chứng hoặc tiền lâm sàng với bệnh này. Tốt hơn là, đối tượng kiểm soát này mắc bệnh liên quan đến synuclein, lấy ví dụ, PD, DLB hoặc LBVAD, trong đó mức α -synuclein tương tự mức chuẩn tham chiếu sẽ chỉ ra đối tượng đó bị mắc bệnh liên quan đến synuclein. Theo một phương án thay thế

hoặc bổ sung như là kiểm soát thứ cấp, đối tượng kiểm soát không mắc bệnh liên quan đến synuclein, trong đó trong đó mức α -synuclein trong hoặc ngoài khoảng mức chuẩn tham chiếu sẽ chỉ ra đối tượng đó bị mắc bệnh liên quan đến synuclein. Tốt hơn là, đối tượng được chẩn đoán và (các) đối tượng kiểm soát là cùng độ tuổi. Mẫu được phân tích này có thể là mẫu dịch bất kỳ của cơ thể tiên đoán là có chứa α -synuclein, lấy ví dụ mẫu máu, CSF, hoặc mẫu nước tiểu.

Mức α -synuclein có thể được đánh giá bởi các phương pháp bất kỳ phù hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, ví dụ, phân tích α -synuclein bởi một hoặc nhiều kỹ thuật được chọn từ nhóm bao gồm thẩm tách Western, kết tủa miễn dịch, phương pháp phân tích miễn dịch liên kết enzym (ELISA), phân tích miễn dịch phóng xạ (RIA), phân loại tế bào hoạt hóa phát huỳnh quang (FACS), điện di gel hai chiều, khối phổ (MS: mass spectroscopy), kỹ thuật ion hóa bằng phương pháp khử hấp phụ laser hỗ trợ matrix-kỹ thuật phân tách các ion dựa trên thời gian bay MALDI-TOF (MALDI-TOF: matrix-assisted laser desorption/ionization-time of flight-MS), tăng cường hiệu ứng laser phân tách/ ion hóa bề mặt-kỹ thuật phân tách các ion dựa trên thời gian bay SELDI-TOF (SELDI-TOF: surface-enhanced laser desorption ionization-time of flight), sắc ký lỏng cao áp (HPLC: high performance liquid chromatography), sắc ký protein lỏng nhanh (FPLC: fast protein liquid chromatography), sắc ký lỏng đa chiều (LC) sau khi đo khối phổ song song (MS/MS), và đo tỷ trọng bằng laser. Tốt hơn là, hình ảnh *in vivo* này của α -synuclein bao gồm chụp cắt lớp phát xạ positron (PET), chụp cắt lớp phát xạ đơn photon (SPECT), hồng ngoại gần (NIR) ảnh quang học hoặc hình ảnh cộng hưởng từ (MRI).

Các phương pháp chẩn đoán bệnh liên quan đến synuclein như bệnh Parkinson hoặc thể Lewy, kiểm soát tiến triển bệnh liên quan đến synuclein, và kiểm soát việc điều trị bệnh liên quan đến synuclein bằng cách sử dụng các kháng thể và các công cụ liên quan phù hợp theo sáng chế cũng được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO2007/011907. Tương tự, các phương pháp phát hiện α -synuclein dựa trên kháng thể đã được mô tả trong công bố đơn quốc tế WO99/50300, WO2005/047860, WO2007/021255 và WO2008/103472, nội dung bộc lộ của tất cả được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các phương pháp này có thể được dùng theo cách như đã mô tả với kháng thể đặc hiệu với α -synuclein, mảnh liên kết, dẫn xuất hoặc biến thể của nó theo sáng chế.

Ngoài các phương pháp này ra, các phương pháp khác cũng đã được bộc lộ và bao gồm trong phần mô tả và trong các ví dụ theo sáng chế. Các ấn phẩm khác liên quan đến các vật liệu, các phương pháp, các sự sử dụng và các hợp chất được sử dụng theo sáng chế có thể thu được từ thư viện và cơ sở dữ liệu cộng đồng, lấy ví dụ, bằng cách sử dụng các thiết bị điện tử. Lấy ví dụ thư viện cộng đồng "Medline" có thể được sử dụng, có máy chủ được đặt tại Trung tâm Thông tin Công nghệ sinh học Quốc gia NCBI (National Center for Biotechnology Information) và/hoặc thư viện được phẩm quốc gia tại NIH (National Institutes of Health). Các cơ sở dữ liệu và các địa chỉ khác như là Viện Tin sinh châu Âu EBI (European Bioinformatics Institute), cơ sở này là một phần của Phòng thí nghiệm sinh học phân tử châu Âu EMBL (European Molecular Biology Laboratory) là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này và cũng có thể thu được bằng cách sử dụng các máy tra cứu internet. Một cái nhìn tổng quan đối với thông tin sáng chế về công nghệ sinh học và một nghiên cứu chung liên quan đến nguồn thông tin sáng chế là hữu ích đối với việc tra cứu ngược và đã biết ở thời điểm hiện tại được nêu trong Berks, TIBTECH 12 (1994), 352-364.

Trên đây đã bộc lộ sáng chế theo cách chung nhất. Trừ khi được nêu với nghĩa khác, thuật ngữ theo sáng chế được định nghĩa như trong từ điển Oxford về hóa sinh và sinh học phân tử, Đại học Oxford phát hành, 1997, sửa đổi năm 2000 và in lại năm 2003, ISBN 0 19 850673 2. Một vài tài liệu đã được viện dẫn trong phần mô tả. Các phần viện dẫn đầy đủ có thể tìm thấy trong phần cuối của bản mô tả này trước yêu cầu bảo hộ. Nội dung tất cả các tài liệu viện dẫn (bao gồm các ấn phẩm tham khảo, công bố đơn yêu cầu cấp bằng sáng chế, công bố bằng sáng chế được viện dẫn trong đơn này và các thông số kỹ thuật của nhà sản xuất, hướng dẫn. v.v.) được đưa vào đây bằng cách viện dẫn; Tuy nhiên, không có nghĩa là các tài liệu viện dẫn bất kỳ là tình trạng kỹ thuật ưu tiên thực sự của sáng chế.

Để hiểu rõ hơn sáng chế, có thể tham khảo các ví dụ cụ thể dưới đây, các ví dụ này được đưa ra chỉ nhằm mục đích minh họa sáng chế mà không làm giới hạn phạm vi của sáng chế.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây minh họa rõ hơn sáng chế, nhưng không được xây dựng để giới hạn phạm vi yêu cầu bảo hộ của sáng chế theo cách bất kỳ. Các thực nghiệm sau

đây trong Ví dụ 1 và Ví dụ 2 được minh họa và mô tả theo kháng thể NI-202.3G12, NI-202.12F4, và NI-202.3D8 được nhân dòng, nghĩa là có chứa đoạn môi gây các đột biến tại đầu N của khung vùng hoạt động vùng biến đổi 1 của Ig và không được điều chỉnh với trình tự biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người của dòng tế bào gốc(GL); xem Fig 1. Tuy nhiên, kháng thể khác của loạt NI-202, cụ thể là những kháng thể được điều chỉnh trình tự GL có cấu trúc tương tự và vì vậy có thể mong chờ các kết quả có thể so sánh được. Các kháng thể này được biểu hiện như phân tử IgG1 của người. Các thực nghiệm trong Ví dụ 3 và 4 được minh họa và mô tả với kháng thể NI-202.12F4 mà đoạn môi gây các đột biến tại vùng dễ biến đổi Ig tại đầu N được điều chỉnh với trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi của người của dòng tế bào gốc (GL); xem Fig 1. Kháng thể này được biểu hiện như phân tử khảm khi các vùng biến đổi điều chỉnh của người được dung hợp với các vùng hằng định IgG2a của chuột cho phép nghiên cứu lượng miễn tính trong mẫu chuột chuyển gen không gây đáp ứng miễn dịch chuột kháng-người.

Vật liệu và phương pháp thực hiện

Các mô tả chi tiết về các phương pháp thông thường, theo sáng chế có thể được tìm thấy trong các tài liệu viện dẫn. Trừ khi được nêu với nghĩa khác, việc xác định các tế bào B đặc hiệu với α -synuclein và nhân dòng phân tử các kháng thể α -synuclein có biểu hiện tính đặc hiệu quan tâm cũng như biểu hiện tái tổ hợp của chúng và chức năng đặc trưng được và có thể thực hiện như được mô tả trong các Ví dụ và phần các Phương pháp bổ sung trong công bố đơn quốc tế PCT/EP2008/000053 với số công bố WO2008/081008, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ nội dung.

Tinh sạch kháng nguyên

His- α -synuclein tái tổ hợp đã thu được bằng biểu hiện tái tổ hợp trong *Escherichia coli* và tiếp đó tinh sạch bằng cách kết tủa do nhiệt độ, sắc ký loại bỏ theo kích thước, trao đổi ion và ái lực Nickel.

Lấy ví dụ, một cấu trúc ADN có chứa cDNA mã hóa α -synuclein dưới sự kiểm soát của promotor T7 đã được sử dụng để biến nạp vào chủng *Escherichia coli* thích hợp như BL21(DE3) và biểu hiện trong 200ml môi trường nuôi cấy tế bào được cảm ứng bằng cách bổ sung isopropyl β -D-thiogalactopyranosit (IPTG) 1mM. Tế bào sau đó được thu sau 4 giờ cảm ứng tại 37°C và tiếp đó tái huyền phù trong 20ml Tris 50mM, NaCl 150mM độ pH 8, theo sau xử lý với sóng siêu âm. Sau khi đun sôi trong

15 phút, thu được 17000g dịch nổi chịu nhiệt. Tương tự, 17000g dịch nổi chịu nhiệt từ *Escherichia coli* mô phỏng được thu gom. Sau khi 17000g dịch nổi chịu nhiệt này (20ml) từ *Escherichia coli* biểu hiện α -synuclein đã gắn đuôi His được điều chỉnh trong Tris 50mM, NaCl 300mM, Imidazol 20mM, pH=8, được nạp lên cột HisTrap HP 1ml (GE Life Science) và HIS- α -synuclein được rửa giải với gradient imidazol 30-500mM. Các phân đoạn có chứa HIS- α -synuclein được gộp với nhau và được pha loãng 1:10 với Tris 50mM, độ pH=8. Các phân đoạn pha loãng được đưa lên cột HiTrap Q HP 1ml (GE Life Science) và các protein liên kết được rửa giải trong gradien NaCl 30-1000mM. Cuối cùng các phân đoạn rửa giải có chứa HIS- α -synuclein được tinh sạch thêm bằng cách sử dụng gel siêu lọc (Superdex 200 10/300 GL). Việc tinh sạch này thu được các lượng HIS- α -synuclein với độ tinh sạch khoảng 99% như đánh giá bằng SDS-PAGE và thuốc nhuộm Coomassie. Nồng độ protein tinh sạch đã được xác định bằng cách sử dụng phương pháp phân tích BCA (Pierce).

Sàng lọc kháng thể α -synuclein

Một nửa vi đĩa 96 giếng (Corning) được phủ với HIS- α -synuclein hoặc α -synuclein (rPeptit) tinh sạch với nồng độ 2 μ g/ml trong đệm phủ (PBS, độ pH=9,6) qua đêm tại 4°C. Đĩa này được rửa trong PBS-T, độ pH=7,6 và các vị trí không liên kết đặc hiệu được phong bế trong 1 giờ ở RT với PBS-T có chứa BSA 2% (Sigma, Buchs, Switzerland). Môi trường điều kiện của tế bào B được tiền hấp thụ trong 1 giờ tại RT với protein chịu nhiệt 10% của *E. coli* trong 1% BSA. Bước tiền hấp thụ này được phát triển sau một số các cố gắng trước đây về bước sàng lọc ELISA mà đã không thành công trong việc phát hiện được các kháng thể đặc hiệu với α -synuclein. Vì vậy, may mắn là bước tiền hấp thụ trên đĩa ELISA với protein chịu nhiệt của *E.coli* đã loại bỏ các kết quả dương tính giả như là các kháng thể dính và kháng thể trực tiếp kháng protein *E. coli* nhiễm tạp có trong các mẫu α -synuclein tái tổ hợp tinh sạch. Sau đó môi trường tiền hấp thụ này được chuyển từ môi trường nuôi cấy tế bào B nhớ vào đĩa ELISA và ủ trong 2 giờ tại RT. Các đĩa ELISA này được rửa với PBS-T và tiếp đó ủ với peroxidaza của cây cải ngựa (HRP) tiếp hợp với các kháng thể đa dòng IgG của lừa kháng người (mảnh đặc hiệu Fc γ). Sau khi rửa với PBS-T, các liên kết của kháng thể của người được xác định bằng cách đo hoạt tính HRP trong phương pháp đo màu chuẩn.

Nhân dòng các phân tử kháng thể α -synuclein

Những mẫu có chứa các tế bào B nhớ thu được từ những người tình nguyện trên 60 tuổi. Tất cả những người tình nguyện này không hề có một dấu hiệu nào của bệnh Parkinson. Các tế bào B nhớ sống sót từ môi trường nuôi cấy các tế bào B nhớ được chọn được thu hoạch và tạo ra mARN. Sau đó, các trình tự chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch thu được bằng cách sử dụng các đoạn môi đặc hiệu cho khung hoạt động¹ của Ig cho tất cả họ chuỗi nặng và chuỗi nhẹ biến đổi của người như các đoạn môi đầu 5' kết hợp với các đoạn môi đặc hiệu đối với tất cả các đoạn J của người (chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kapa) và các đoạn C (chuỗi nhẹ lambda) như đoạn môi đầu 3' (Marks et al., Mol. Biol. 222 (1991), 581-597; de Haard et al., J. Biol. Chem. 26 (1999), 18218-18230).

Việc xác định dòng kháng thể với tính đặc hiệu mong muốn được thực hiện bằng cách tái sàng lọc với ELISA theo biểu hiện của kháng thể toàn vẹn tái tổ hợp. Biểu hiện tái tổ hợp của các kháng thể IgG1 toàn vẹn của người hoặc các kháng thể IgG2a khám thu được theo trình tự biến đổi chèn vào của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ "trong khung đọc đúng" vào các vector biểu hiện mà bổ sung trình tự vùng biến đổi này có trình tự mã hóa peptit dẫn tại đầu 5' và đầu 3' với trình tự mã hóa (các) vùng hằng định thích hợp. Tại đầu của các đoạn môi này có chứa các vị trí enzym giới hạn được thiết kế để dễ dàng nhân dòng các trình tự biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong các vector biểu hiện kháng thể. Chuỗi nặng của globulin miễn dịch được biểu hiện bằng cách chèn thêm sản phẩm RT-PCR của chuỗi nặng globulin miễn dịch này đúng khung trong vector biểu hiện chuỗi nặng có peptit tín hiệu và vùng hằng định gamma 1 của globulin miễn dịch của người hoặc gamma 2a của globulin miễn dịch của chuột. Chuỗi nhẹ kapa của globulin miễn dịch được biểu hiện bằng cách chèn thêm sản phẩm RT-PCR của chuỗi nhẹ kapa của NI-202.3D8 đúng khung trong một vector biểu hiện chuỗi nhẹ được cung cấp peptit tín hiệu và vùng hằng định của chuỗi nhẹ kapa của globulin miễn dịch của người. Chuỗi nhẹ lambda NI-202.12F4 và NI-202.3G12 của globulin miễn dịch NI-202.12F4 và NI-202.3G12 được biểu hiện bằng cách chèn thêm sản phẩm RT-PCR của chuỗi nhẹ lambda đúng khung trong vector biểu hiện chuỗi nhẹ lambda có peptit tín hiệu và vùng hằng định chuỗi nhẹ lambda của globulin miễn dịch của người hoặc của chuột.

Các kháng thể đơn dòng tái tổ hợp chức năng thu được từ việc đồng chuyển nhiễm vào HEK293 hoặc tế bào CHO (hoặc dòng tế bào tiếp nhận thích hợp bất kỳ của người hoặc có nguồn gốc từ chuột) của vector biểu hiện chuỗi nặng Ig và vector biểu hiện chuỗi nhẹ kappa hoặc lambda của Ig. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người tiếp đó được tinh sạch từ môi trường điều kiện thông qua việc sử dụng kỹ thuật tinh sạch cột protein A chuẩn. Kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người có thể được sản sinh ra với số lượng không hạn chế bằng cách sử dụng hoặc là tế bào chuyển nhiễm tạm thời hoặc là tế bào chuyển nhiễm ổn định. Tế bào dòng sản sinh kháng thể đơn dòng tái tổ hợp của người có thể tạo ra hoặc là bằng cách sử dụng các vector biểu hiện Ig trực tiếp hoặc là bằng cách tái nhân dòng vùng các biến đổi Ig vào các vector biểu hiện khác nhau. Các biến thể dẫn xuất như là F(ab), F(ab)₂ và scFv cũng có thể được tạo ra từ vùng biến đổi Ig này.

Các kháng thể

Kháng thể pan α -synuclein đa dòng của thỏ (Abcam), kháng thể đơn dòng LB509 đặc hiệu α -synuclein của chuột (Invitrogen), kháng thể Syn211 (Sigma) và dòng 42 (BD Biosciences) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Các kháng thể α -synuclein NI202.3G12, NI202.12F4 và NI-202.3D8 tái tổ hợp của người là các kháng thể theo sáng chế. Các kháng thể này được biểu hiện trong HEK293 hoặc tế bào CHO và sau đó môi trường điều kiện được sử dụng trực tiếp trong các ứng dụng tiếp theo trừ khi được nêu khác. Trong các ví dụ từ 3 đến 5, kháng thể tái tổ hợp tinh sạch theo sáng chế được sử dụng.

ELISA trực tiếp

Các kháng nguyên được phủ với nồng độ xác định trong PBS, độ pH=9,6 trên một nửa vi đĩa 96 giếng (Corning) qua đêm tại 4°C. Đĩa này được rửa với PBS-T độ pH 7,6 và các vị trí liên kết không đặc hiệu được phong bế trong 1 giờ tại RT với PBS-T có chứa BSA 2% (Sigma). Các mẫu đoạn dò (các kháng thể sơ cấp) tiếp đó được chuyển vào các giếng ủ trong 2 giờ tại RT. Sau khi rửa trong PBS-T, độ pH=7,6, các giếng này được ủ với peroxidaza của cây cải ngựa (HRP) tiếp hợp với các kháng thể thứ cấp đa dòng kháng người (đối với các kháng thể tái tổ hợp của người), kháng thỏ (đối với kháng thể synuclein tổng hợp pan) hoặc kháng chuột (đối với LB509 hoặc Syn211) trong 1 giờ tại RT. Sau khi rửa nghiêm ngặt với PBS-T, các liên kết với đoạn

dò được xác định bằng cách đo hoạt tính HRP trong phương pháp đo màu chuẩn bằng cách sử dụng 3,3',5,5'-tetramethylbiphenyl-4,4'-diamin (Sigma) như cơ chất màu.

Thẩm tách Western và nhuộm màu protein bằng thuốc nhuộm Coomassie

Để đánh giá liên kết với α -synuclein của người và chuột, não đông lạnh của chuột chuyển gen α -synuclein hoặc kiểu đại được đồng nhất hóa trong PBS (10ml/g khối lượng ướt) bằng cách sử dụng thiết bị đồng nhất Dounce. Dịch chiết được ly tâm với 100.000g và phần dịch nổi được chỉ định phân đoạn tan. Phân đoạn pha loãng hoặc các protein tái tổ hợp (750ng) được trộn cùng với thuốc nhuộm, gia nhiệt 65°C trong 10 phút và nạp 0,75 μ g vào mỗi làn và tách trên SDS-PAGE Tris-Glyxin 4-20%. Các gel này hoặc là được nhuộm trong dung dịch Coomassie Brilliant blue R 250 0,025% (Fluka) hoặc điện thẩm tách vào màng chuyển nitroxeluloza. Màng thẩm tách này được ủ với kháng thể sơ cấp trong 2 giờ. Liên kết của kháng thể sơ cấp được phát hiện bằng cách sử dụng các kháng thể thứ cấp kháng người tiếp hợp với HRP. Màng thẩm tách được phát triển bằng cách sử dụng ECL có chất phản ứng phát hiện thẩm tách Western (GE Healthcare).

Để đánh giá liên kết với các α -synuclein đơn thể và thể kết tụ, các dịch chiết não được điều chế trong PBS có chứa Triton X100 0,5% sau đó ly tâm tại 1000 g trong 5 phút. Các phần dịch nổi được tách ra với điện di trên gel NuPAGE Bis-Tris 4-12% và phân tích bằng WB.

Thử nghiệm Pole

Chuột được kiểm tra từ khi bắt đầu tối, lúc mà chúng hoạt động nhất. Cọc được làm từ mẫu gỗ với chiều dài 50cm và chiều rộng 1cm bọc vải để treo lên dễ dàng. Nền cọc đặt trên cửa lồng chuột. Chuột được đặt trên đỉnh của cọc và thời gian bò xuống và thời gian treo lên lồng ở được ghi lại với trên 5 thử nghiệm với các thời gian giữa là 30 phút. Kết quả thử nghiệm tốt nhất được phân tích.

Thử nghiệm phản ứng đối với các chất tác động thần kinh

Chuột được thử nghiệm tại thời điểm bắt đầu pha tối, lúc mà chúng hoạt động nhất. Thử nghiệm được tiến hành với ánh sáng mờ (40 lux). Hệ thống dùng trong phản ứng đối với các chất tác động thần kinh bao gồm hai cánh mở và hai cánh đóng (chiều dài cánh : 30cm; rộng: 5cm). Các cánh mở với cạnh nhỏ 1 cm và các cánh đóng được bao quanh bởi tường 15 cm. Tại thời điểm bắt đầu nhiệm vụ, chuột được đặt vào trung tâm hệ thống dùng trong phản ứng đối với các chất tác động thần kinh đối diện với

một cánh mở. Chuột được quay phim khi khám phá hệ thống này trong 5 phút. Thời gian cần đối với các cánh đóng và mở và khoảng cách bao gồm được đo và phân tích.

Chuột chuyển gen

Chuột chuyển gen α -synuclein B6; C3-Tg(Prnp-SNCA*A53T)83Vle/J (Giasson et al., Neuron. 34 (2002), 521-533) và chuột kiểu đại tương ứng được nhốt trong các điều kiện lồng chuẩn có nghịch đảo chu kỳ sáng/tối đảo ngược 12giờ:12giờ được thoải mái tiếp cận với nước và thức ăn. Các nhóm điều trị được cân bằng giữa độ tuổi và giới tính.

Xác định mức NI-202.12F4 và α -synuclein trong huyết thanh chuột

Các mức NI-202.12F4 trong huyết thanh được xác định bằng cách sử dụng ELISA α -synuclein trực tiếp có sử dụng NI-202.12F4 tái tổ hợp với nồng độ chuẩn đã biết. Để xác định các mức α -synuclein trong huyết thanh của người, sử dụng ELISA đặc hiệu dạng kẹp (Invitrogen, USA).

Ví dụ 1: Xác định các kháng thể liên kết đặc hiệu với α -synuclein của người với các tính đặc hiệu epitop khác nhau

α -synuclein là protein không cuộn gập một cách nguyên thủy có chiều dài 140 axit amin (aa), có ba vùng. Ba vùng đó là vùng đầu N kỵ và ưa nước (axit amin 1-60), vùng trung tâm (axit amin 61-95) và vùng có tính axit đầu C (axit amin 96-140). Để hiểu rõ tính đặc hiệu liên kết của các kháng thể α -synuclein tái tổ hợp của người, vùng α -synuclein có chứa trình tự nhận biết đã được xác định. Cấu trúc α -synuclein cắt ngắn axit amin 1-60, axit amin 1-95, axit amin 61-140 và axit amin 96-140 được phủ với nồng độ bằng nhau lên đĩa các ELISA và tiếp đó kháng thể tự kháng tái tổ hợp α -synuclein của người NI-202.3G12 và NI-202.12F4 được dò đối với liên kết của các thể cắt ngắn này.

Bất ngờ là, NI-202.3G12 chỉ liên kết với α -synuclein có chiều dài đầy đủ được phủ lên đĩa nhưng không liên kết với dạng bất kỳ trong số bốn thể cắt ngắn thử nghiệm (Fig. 2A). Điều này cho thấy rằng epitop nhận dạng của NI-202.3G12 là một motif cấu trúc khác với trình tự nhận biết sơ cấp dạng thẳng.

Mặt khác, NI-202.12F4 liên kết với các mảnh α -synuclein bao gồm các aa 1-60 (Fig. 2B) nhưng không liên kết với các mảnh cắt ngắn đầu N bao gồm các axit amin 61-140 hoặc 96-140. Điều này thể hiện rằng epitop của nó được định vị trong vùng

đầu N. Chú ý là, đặc tính các kháng thể đơn dòng của chuột liên kết một cách chọn lọc với α -synuclein trong các thể vùi bệnh lý, vén mở là các epitop của chúng là trong nhiều đoạn của đầu N (Waxman et al., *Acta Neuropathol.* 116 (2008), 37-46).

Ngoài ra, các kết quả sơ bộ trong phân tích ELLISA trực tiếp được tiến hành với kháng thể NI-202.3D8 vén mở là NI-202.3D8 nhận biết một cách đặc hiệu đầu C của α -synuclein, cụ thể là axit amin 96-140. Việc loại bỏ các axit amin quan trọng 125–140 trong vùng đầu C làm thay đổi lớn đối với sự kết tụ của α -synuclein trong các não bệnh nhân mắc bệnh Dementia với thể Lewy (LBD) cũng như các mô hình động vật chuyển gen, có sự tích tụ thừa các mảnh α -synuclein đầu C. Các nghiên cứu này đã chỉ ra rằng các kháng thể có khả năng nhận diện vùng đầu C có tiềm năng về hiệu quả điều trị; xem Masliah et al., *Neuron*, 46 (2005), 857–868.

Để tránh việc α -synuclein đầu C bao gồm các dạng cắt ngắn được phủ một cách không có hiệu quả phủ trên đĩa ELISA, việc lập bản đồ epitop của kháng thể đơn dòng alpha synuclein LB509 của chuột LB509 (Baba et al., *Am. J. Pathol.* 152 (1998), 879–884) đã được thực hiện. LB509 liên kết với epitop đầu C (Jakes et al., *Neuroscience Letters* 269 (1999), 13-16). Như được thể hiện trong Fig. 2C, nghiên cứu này đã xác nhận epitop đầu C của LB509 và vì vậy xác nhận hiệu quả phủ của các mảnh α -synuclein đầu C. Kết luận, việc lập bản đồ epitop của các kháng thể α -synuclein tái tổ hợp của người trong các thí nghiệm này theo sáng chế cho thấy các kháng thể này kháng trực tiếp các epitop khác nhau bao gồm epitop cấu hình và các cấu trúc bệnh lý tiềm năng tại đầu N và đầu C.

Ví dụ 2: Các kháng thể của người đặc hiệu đối với α -synuclein

Các synuclein α , β và γ là các protein tương đồng cao mà phần lớn được biểu hiện trong hệ thần kinh, cơ xương và tim. Tuy nhiên, chỉ có α -synuclein bất thường mới liên kết với phổ rộng các bệnh CNS trong khi β -synuclein được cho là chất ức chế α -synuclein dạng kết tụ và có thể bảo vệ hệ thần kinh trung ương trước tác động gây độc của α -synuclein. Vì vậy các kháng thể (trị liệu) kháng các biến thể bệnh lý α -synuclein tốt hơn là không phản ứng chéo với β và γ -synuclein. Nhằm hỗ trợ việc sử dụng tính đặc hiệu và khả năng điều trị bệnh của các kháng thể tái tổ hợp kháng α -synuclein của người, các kháng thể ứng tuyển được dò với α , β và γ -synuclein liên kết trong phân tích ELLISA trực tiếp và phân tích thẩm tách Western (WB: Western Blotting). Trước tiên, α , β và γ -synuclein tái tổ hợp được phủ lên đĩa ELISA với nồng

độ phủ bằng nhau (2 μ g/ml) và tiếp đó được ủ hoặc là với kháng thể pan synuclein đối chứng hoặc các kháng thể tái tổ hợp α -synuclein của người. Kháng thể pan synuclein này phản ứng với tất cả ba dạng protein synuclein được phủ lên các đĩa ELISA (Fig 3A). Tiếp đó các kháng thể tái tổ hợp α -synuclein của người được dò với liên kết với α -synuclein đặc hiệu. Cả NI-202.3G12 và NI-202.12F4 phản ứng với α -synuclein phủ nhưng không phản ứng với β và γ synuclein (Fig. 3A và 3B).

Tương tự, tính đặc hiệu của các kháng thể tái tổ hợp cũng được khảo sát bằng cách sử dụng phương pháp phân tích WB. Thuộc nhuộm protein Coomassie xác nhận nồng độ bằng nhau của cả ba protein synuclein được đưa lên phân tích SDS PAGE (Fig 4A). Phân tích WB cho thấy rằng NI-202.12F4 liên kết một cách chọn lọc với α -synuclein (Fig. 4B) trong đó không có kháng thể sơ cấp thì không phát hiện được tín hiệu (Fig. 4C). NI-202.3G12 liên kết với α -synuclein trên WB đã không phát hiện được. Điều này là phù hợp với epitop cấu trúc khác so với trình tự nhận dạng thẳng của NI-202.3G12. Những phát hiện này đã chứng minh rằng kháng thể tái tổ hợp alpha synuclein của người được mô tả trong sáng chế có thể là kháng thể đặc hiệu cao.

Tất cả các thí nghiệm tiếp theo được thực hiện với kháng thể khảm NI-202.12F4 của chuột.

Ví dụ 3: Tính đặc hiệu liên kết của kháng thể NI-202.12F4

Liên kết đặc hiệu với α -synuclein của người ưu tiên với các dạng α -synuclein kết tụ

Để đánh giá liên kết của NI-202.12F4 với α -synuclein từ người và chuột, các dịch chiết não được điều chế từ chuột chuyển gen α -synuclein A53T và kiểu dại và kháng thể liên kết được phân tích bằng phân tích thẩm tách Western. NI-202.12F4 phát hiện bằng rõ nét tương ứng với α -synuclein trong dịch chiết não từ chuột chuyển gen A53T α -synuclein của người trong khi hầu như không có mặt bằng như vậy trong các dịch chiết não của chuột kiểu dại (Figs 5 A), điều này cho thấy rằng kháng thể liên kết đặc hiệu với α -synuclein của người nhưng không liên kết với α -synuclein của chuột. Đối với kháng thể thương mại LB509 cũng thu được các kết quả tương tự (Jakes et al., Neuroscience Letters 269 (1999), 13-16) mà kháng thể này kháng một epitop đặc hiệu đối với α -synuclein của người. Ngược lại, dòng kháng thể thương mại 42 (van der Putten et al., J. Neurosci. 20 (2000), 6021-6029) mà dòng kháng thể này đã được báo cáo là liên kết với cả hai loại α -synuclein, phát hiện được cả protein α -

synuclein của người cũng như của chuột. Dữ liệu này cho thấy rằng NI-202.12F4 ưu tiên liên kết với α -synuclein của người.

Để đánh giá liên kết của NI-202.12F4 với các dạng bệnh lý cũng như các dạng α -synuclein kết tụ gây bệnh của người, các dịch chiết vỏ não từ người đối chứng khỏe mạnh và bệnh nhân mất trí thể Lewy (DLB) cũng như dịch chiết từ não chuột kiểu dại và chuột chuyển gen α -synuclein A30P của người (Kahle et al. J. Neurosci. 20 (2000), 6365-73) đã được chuẩn bị, được phân tách trên gel SDS và được phân tích bằng phương pháp thẩm tách Western. NI-202.12F4 phát hiện với độ nhạy cao với dải rõ nét phản ánh các dạng oligo và dạng sợi của α -synuclein kết tụ trong DLB và trong dịch chiết não chuột chuyển gen α -synuclein A30P nhưng không trong các dịch chiết của đối chứng khỏe mạnh và dịch chiết kiểu dại (Fig 5 B). Ngược lại đã quan sát thấy các liên kết tối thiểu với các dạng monome của α -synuclein trong mô của người hoặc trong mô của chuột kiểu dại và liên kết vừa phải trong các dịch chiết não chuột chuyển gen A30P α -synuclein có biểu hiện protein α -synuclein quá mức. Ngược lại, kháng thể dòng 42 cho thấy dạng liên kết đối nghịch trong phân tích thẩm tách Western, phát hiện các dạng đơn thể và các mảnh α -synuclein với độ nhạy cao và liên kết kém với các dạng α -synuclein kết tụ. Kết quả này đã chỉ ra rằng NI-202.12F4 ưu tiên liên kết với dạng kết tụ gây bệnh của α -synuclein như là các oligo và các dạng sợi hơn là các đơn thể α -synuclein bệnh lý.

NI-202.12F4 liên kết với kiểu dại và bệnh do các đột biến alpha synuclein của người với ái lực cao

Nồng độ hiệu quả bán phần cao nhất (EC50) được xác định đối với kiểu dại cũng như bệnh gây ra bởi các thể đột biến α -synuclein của người bằng cách sử dụng ELISA α -synuclein trực tiếp. Liên kết với ái lực cao đã quan sát được đối với kiểu dại cũng như các dạng đột biến A30P, E46K và A53T của α -synuclein của người (Fig 6).

NI-202.12F4 tái tổ hợp ưu tiên liên kết với các α -synuclein dạng bệnh lý trong não

Việc liên kết của NI-202.12F4 đối với α -synuclein được đặc trưng hơn bởi nhuộm hóa mô miễn dịch của các phần não từ chuột chuyển gen α -synuclein và các bệnh nhân có bệnh lý thần kinh với bệnh Parkinson hoặc mất trí với thể Lewy. NI-202.12F4 cho thấy nhuộm màu rõ nét dạng α -synuclein bệnh lý bao gồm thể Lewy và sợi trục Lewy tương tự thể vùi cũng như tế bào soma hình cây và các tích tụ tiếp hợp của α -synuclein trong phần nổi tự do từ chuột chuyển gen có biểu hiện hoặc là α -

synuclein A53T của người (Fig 7 A) hoặc là α -synuclein A30P (Fig 7 B) cũng như trong mô não người mắc bệnh Parkinson và mất trí thể Lewy (Fig 7 C, D). Ngược lại, đối với kháng thể thương mại Syn211 (Giasson et al., J. Neurosci. Res. 59 (2000), 528-33), kháng thể này cũng phát hiện α -synuclein tiếp hợp bệnh lý với độ nhạy cao (Fig 7 E), NI-202.12F4 liên kết một cách ưu tiên với α -synuclein dạng kết tụ gây bệnh của α -synuclein như được minh họa bởi nhuộm màu hóa mô miễn dịch chuột chuyên gen α -synuclein A30P của người (Fig 7 B). Hầu như không thấy liên kết của NI-202.12F4 trong não của chuột kiểu đại (Fig 7 F) khi so với kháng thể thứ cấp chỉ được nhuộm đối chứng (Fig 7G) xác nhận liên kết ưu tiên với α người so với α -synuclein chuột như đã quan sát thấy trong phân tích thẩm tách Western (Fig 5). Ngược lại, kháng thể thương mại dòng 42 (van der Putten et al., J. Neurosci. 20 (2000), 6021-6029), kháng thể này đã được báo cáo là liên kết với cả α -synuclein của người cũng như dạng có nguồn gốc của từ chuột, thể hiện nhuộm màu rõ ràng tiếp hợp protein α -synuclein của chuột trong các phần não của chuột kiểu đại (Fig 7 H).

NI-202.12F4 thể hiện liên kết ưu tiên với α -synuclein của người tại nồng độ phủ cao chỉ rõ epitop cấu hình

Nồng độ hiệu quả bán phần cao nhất (EC50) chỉ khả năng của một kháng thể được xác định với nồng độ phủ thấp và cao của α -synuclein tái tổ hợp bằng cách sử dụng ELISA α -synuclein trực tiếp. Liên kết ái lực cao của NI-202.12F4 tái tổ hợp với EC50 khoảng ~100pM đã thu được đối với mật độ protein α -synuclein phủ cao (20 μ g/ml). Tại các nồng độ α -synuclein phủ thấp, cho thấy ái lực giảm nhanh chóng, với sự tăng EC50 tương ứng gần khoảng 100 lần (Fig 8 A). Ngược lại, kháng thể thương mại Syn211 (Giasson et al., J. Neurosci. Res. 59 (2000), 528-33) trực tiếp kháng epitope thẳng trong đầu C của α -synuclein cho thấy chúng không giảm ái lực liên kết tại các mật độ alpha synuclein phủ thấp hơn (Fig 8 B). Các phát hiện này đã cho thấy rằng NI-202.12F4 ưu tiên đích với một epitop cấu trúc của α -synuclein, mà epitop này được hình thành với nồng độ α -synuclein cao. Kết quả này phù hợp với đặc tính liên kết hóa mô miễn dịch của NI-202.12F4, kết quả này cho thấy rằng nó ưu tiên liên kết với dạng bệnh lý của α -synuclein dạng kết tụ như là α -synuclein các dạng sợi hoặc các dạng oligo. Như đã quan sát thấy đối với α -synuclein có chiều dài toàn vẹn, NI-202.12F4 liên kết với α -synuclein dạng cắt ngắn 1-60 thể hiện sự phụ thuộc tương đương vào nồng độ phủ chỉ rõ epitop cấu hình mà epitop này nằm trong các axit amin

1-60 của protein α -synuclein (Fig 8 C). Tuy nhiên có thể không loại trừ khả năng là axit amin 60-140 của α -synuclein này có thể có ảnh hưởng đến hình dạng epitop đầu N. Đáng chú ý là, axit amin 1-60 đầu N trong α -synuclein của người có chứa đột biến A53T có độ tương đồng 100% so với đầu N α -synuclein của chuột. Vì vậy ưu tiên quan sát đối với α -synuclein của người so với dạng tiến hóa thẳng cùng nguồn gốc của chuột có thể do ảnh hưởng phần đầu C của synuclein khi tiếp cận hoặc hình thành epitop NI-202.12F4 ưu tiên tại đầu N. Các nghiên cứu lập bản đồ epitop sử dụng các mảnh dẫn xuất đầu N của α -synuclein (axit amin 1-20; 21-40; 41-60; 11-30; 31-50) vén mở sự không liên kết của kháng thể NI-202.12F4 với một peptit bất kỳ trong số các peptit này, cho thấy rằng các vùng này không tác động đến liên kết của NI-202.12F4 (Fig 8 D).

Ví dụ 4: Kháng thể tái tổ hợp có nguồn gốc từ người kháng alpha-synuclein làm tăng hoạt động cử động và tập tính trong phản ứng đối với các chất tác động thần kinh của mẫu chuột chuyển gen mắc bệnh Parkinson

Để đánh giá hiệu quả về mặt dược lý học của việc điều trị với NI-202.12F4, chuột chuyển gen 10,5 tháng tuổi biểu hiện quá mức gen chuyển α -synuclein A53T của người (Giasson et al., Neuron 34 (2002), 521-533) được điều trị hàng tuần với liều lượng kháng thể khảm NI-202.12F4 tái tổ hợp 5mg/kg hoặc chất dẫn thuốc đối chứng trong toàn bộ 4 tháng. Sau 2 tháng điều trị, hiệu suất hoạt động được tính toán trong thử nghiệm Pole. Chuột được điều trị bằng NI-202.12F4 cho thấy tăng đáng kể hiệu suất hoạt động khi so với nhóm được điều trị bằng chất dẫn thuốc với việc làm giảm đáng kể thời gian phản ứng trên cọc (T hoạt động; $p < 0,001$; $n = 17-19$ con trong một nhóm) cũng như tổng thời gian chạm xuống nền lồng (T tổng số; $p < 0,05$; $n = 17-19$ con trong một nhóm) như được thể hiện trong Fig 9. Trong thử nghiệm tập tính thứ hai, hiệu quả điều trị với các chất tác động thần kinh được phân tích. Chuột chuyển gen α -synuclein A53T trước đó đã có biểu hiện khiếm khuyết về tập tính phản ứng đối với các chất tác động thần kinh, mất nhiều thời gian hơn trong các cánh mở khi so với các đối chứng kiểu dại (George et al., Exp. Neurol., 210 (2008), 788-92). Như được thể hiện trong Fig 10 điều trị mãn tính với NI-202.12F4 đưa đến một sự tăng cường đáng kể tập tính phản ứng đối với các chất tác động thần kinh trong động vật chuyển gen α -synuclein A53T. Chuột được điều trị bằng kháng thể giảm đáng kể thời gian và gồm khoảng cách trong các lần mở cửa khi so với động vật được điều trị bằng tá dược

($p < 0,05$; $n = 17-19$ con trong một nhóm) trong khi mức hoạt tính động là tương đương đối với cả hai nhóm. Các kết quả này đã chứng minh rằng việc điều trị mãn tính với kháng thể NI-202.12F4 dẫn đến cải thiện đáng kể hiệu suất hoạt động và trở lại tập tính phản ứng đối với các chất tác động thần kinh bình thường trong các mẫu chuột bị bệnh Parkinson chuyển gen α -synuclein.

Ví dụ 5: Kháng thể NI-202.12F4 tăng cường các mức synuclein trong huyết thanh của các mẫu chuột chuyển gen synuclein mắc bệnh Parkinson

Chuột 10,5 tháng tuổi được chuyển gen α -synuclein A53T của người được điều trị tiêm trong màng bụng hàng tuần trong hai tháng với NI-202.12F4 thể khảm 5mg/kg hoặc PBS. Sau 24 giờ tại lần tiêm cuối cùng, thu các mẫu huyết thanh và xác định nồng độ kháng thể điều trị huyết thanh và α -synuclein của người bằng ELISA (Fig 11). Mức α -synuclein của người trong huyết thanh tăng đáng kể hơn 10 lần khi so với động vật được điều trị bằng chất dẫn thuốc ($25 \pm 4,1 \text{ ng/ml}$ đối với nhóm điều trị bằng NI-202.12F4 so với $1,9 \pm 1,2 \text{ ng/ml}$ đối với nhóm PBS, $p = 0,0002$) chứng minh sự điều hòa được lực học của α -synuclein dựa trên việc điều trị với NI-202.12F4. Các hiệu quả tương tự đã quan sát được khi điều trị cấp tính với kháng thể trong chuột chuyển gen α -synuclein A30P của người. Tương tự đối với các mẫu chuột chuyển gen α -synuclein A53T và A30P của người, α -synuclein chủ yếu biểu hiện trong não, việc tăng tuần hoàn α -synuclein của người có thể do NI-202.12F4 điều hòa dòng α -synuclein thực từ não đến vùng ngoại vi.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó, chứa vùng biến đổi của chuỗi nặng (VH) và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ (VL), mỗi VH và VL chứa các vùng quyết định bổ trợ (CDR) CDR1, CDR2 và CDR3, trong đó:
 - a) VH CDR1 bao gồm các gốc 31-35 của SEQ ID NO: 9;
 - b) VH CDR2 bao gồm các gốc 50-68 của SEQ ID NO: 9;
 - c) VH CDR3 bao gồm các gốc 101-102 của SEQ ID NO: 9;
 - d) VL CDR1 bao gồm các gốc 23-33 của SEQ ID NO: 12;
 - e) VL CDR2 bao gồm các gốc 49-55 của SEQ ID NO: 12; và
 - f) VL CDR3 bao gồm các gốc 88-98 của SEQ ID NO: 12.
2. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm 1, trong đó VH chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 9 và SEQ ID NO: 10.
3. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm 1, trong đó VL chứa trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 12 và SEQ ID NO: 13.
4. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm 1, trong đó VH chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 9 hoặc SEQ ID NO: 10 và VL chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12 hoặc SEQ ID NO: 13.
5. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó chứa VH và VL, trong đó VH chứa trình tự axit amin nêu trong của SEQ ID NO: 9 và VL chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 12.
6. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó chứa VH và VL, trong đó VH chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 10 và VL chứa trình tự axit amin nêu trong SEQ ID NO: 13.
7. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể này chứa vùng hằng định của chuỗi nặng IgG1 người và vùng hằng định của chuỗi nhẹ lambda người.
8. Polynucleotit mã hóa kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.
9. Vector chứa polynucleotit theo điểm 8.
10. Tế bào chủ chứa vector theo điểm 9.

11. Phương pháp tạo ra kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó, trong đó phương pháp này bao gồm các bước:

- (a) nuôi cấy tế bào theo điểm 10; và
- (b) tách kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó ra khỏi sản phẩm nuôi cấy.

12. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó được mã hóa bởi polynucleotit theo điểm 8 hoặc thu được bằng phương pháp theo điểm 11.

13. Kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này:

- (i) được đánh dấu phát hiện được, trong đó dấu phát hiện được được chọn từ nhóm bao gồm enzym, đồng vị phóng xạ, chất phát huỳnh quang, và kim loại nặng; hoặc
- (ii) được gắn với thuốc.

14. Chế phẩm chứa kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, 12 và 13, polynucleotit theo điểm 8, vector theo điểm 9 hoặc tế bào theo điểm 10 trong đó chế phẩm này là:

- (i) được phẩm có chứa thêm chất mang được dụng; hoặc
- (ii) chế phẩm chẩn đoán có chứa thêm chất phản ứng chẩn đoán dựa trên tác nhân miễn dịch hoặc axit nucleic.

15. Kit để chẩn đoán bệnh liên quan đến synuclein, trong đó kit này chứa kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, 12 và 13, polynucleotit theo điểm 8, vector theo điểm 9, hoặc tế bào theo điểm 10 cùng với thuốc thử và hoặc hướng dẫn sử dụng.

16. Chế phẩm chứa kháng thể kháng α -synuclein hoặc mảnh liên kết với α -synuclein của nó theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, 12 và 13 được gắn với tác nhân điều trị hoặc tác nhân chẩn đoán để phát hiện hoặc hướng đích *in vivo* tác nhân điều trị và/hoặc chẩn đoán đến α -synuclein trong cơ thể người hoặc động vật, trong đó α -synuclein được phát hiện bằng phương pháp chụp cắt lớp phát xạ positron (PET: positron emission tomography), chụp cắt lớp phát xạ photon đơn (SPECT: single photon emission tomography), chụp ảnh quang học hồng ngoại gần (NIR: near infraed) hoặc chụp ảnh cộng hưởng từ (MRI: magnetic resonance imaging) hoặc kết hợp của các phương pháp này.

A

NI-202.3G12-VHB1 (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VHB1; SEQ ID NO:3)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNFIDFHIHWVRQAPGEGLEWMGWSNPQSGNSSSAQ
 -----FR3-----CDR3-----JH-----
 RFQGRVTMTTDTSMSAAYMDLNWLTLDLTAVYYCTRPHDGAGNYRFDTWGQGTLLTVSS

NI-202.3G12-VHB1-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VHB1 so sánh với trình tự
 dòng tế bào gốc; SEQ ID NO:4)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 QVQLVQSGAEVKKPGASVRLSCRASGYNFIDFHIHWVRQAPGEGLEWMGWSNPQSGNSSSAQ
 -----FR3-----CDR3-----JH-----
 RFQGRVTMTTDTSMSAAYMDLNWLTLDLTAVYYCTRPHDGAGNYRFDTWGQGTLLTVSS

NI-202.3G12-VLc1 (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VLc1, SEQ ID NO:6)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 QSVLTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALPKHYAHWYQQKPGQVPIVVIYKDTERPSGIPERFS
 -----CDR3-----JK-----
 GSTSGTTVTLTISGVQAEDEAHYYCQSADVSSTYVVFSGGKLTVL

NI-202.3G12-VLc1-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VLc1 so sánh với trình tự
 dòng tế bào gốc; SEQ ID NO:7)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 SYELTQPPSVSVAPGQTARITCSGDALPKHYAHWYQQKPGQVPIVVIYKDTERPSGIPERFS
 -----CDR3-----JK-----
 GSTSGTTVTLTISGVQAEDEAHYYCQSADVSSTYVVFSGGKLTVL

Fig. 1

B

NI-202.12F4-VHA1b (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VHA1b; SEQ ID NO:9)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVQLVQSGGGLVEPGGSLRLSCAIVSGFDFEKAWMSWVRQAPGQGLQWVARIKSTADGGTTSY

-----FR3-----CDR3----JH---
AAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTEDTAVYYCTSAHWGQGTLVTVSS

NI-202.12F4-VHA1b-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VHA1b so sánh với trình tự dòng tế bào gốc; SEQ ID NO:10)

FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
 EVQLVESGGGLVEPGGSLRLSCAIVSGFDFEKAWMSWVRQAPGQGLQWVARIKSTADGGTTSY

-----FR3-----CDR3----JH---
AAPVEGRFIISRDDSRNMLYLQMNSLKTEDTAVYYCTSAHWGQGTLVTVSS

NI-202.12F4-VLa1 (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VLa1; SEQ ID NO:12)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
 QSVLTQPPSVSVSPGQTARITCSGEALPMQFAHWYQQRPGKAPVIVVYKDSERPSGVPERFS

-----CDR3-----JK-----
 GSSSGTTATLTITGVQAEDADYYCQSPDSTNTYEVFGGGTKLTVL

NI-202.12F4-VLa1-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VLa1 so sánh với trình tự dòng tế bào gốc; SEQ ID NO:13)

FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
SYELTQPPSVSVSPGQTARITCSGEALPMQFAHWYQQRPGKAPVIVVYKDSERPSGVPERFS

-----CDR3-----JK-----
 GSSSGTTATLTITGVQAEDADYYCQSPDSTNTYEVFGGGTKLTVL

Fig. 1 (tiếp)

C

NI-202.3D8-VHE1 (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VHE1; SEQ ID NO:15)

```
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
EVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAISWVRQAPGKGLEWVAIIISNDGSRKYYAD
-----FR3-----CDR3-----JH-----
SVKGRFTISRDNSTLDLEMNRLRDEDTAVYYCAKRGTYASRCKAFDFWGQGTLLTVSS
```

NI-202.3D8-VHE1-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VHE1 so sánh với trình tự dòng tế bào gốc
SEQ ID NO:16)

```
FR1-----CDR1-FR2-----CDR2-----
QVQLVESGGGVVQPGRSLRLSCAASGFTFSTYAISWVRQAPGKGLEWVAIIISNDGSRKYYAD
-----FR3-----CDR3-----JH-----
SVKGRFTISRDNSTLDLEMNRLRDEDTAVYYCAKRGTYASRCKAFDFWGQGTLLTVSS
```

NI-202.3D8-VKa1 (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VKa1; SEQ ID NO:18)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQLTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQISGWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDNYWTFGQGTKVEIK
```

NI-202.3D8-VKa1-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VK1 so sánh với trình tự dòng tế bào
SEQ ID NO:19)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQMTQSPSTLSASVGDRVITITCRASQISGWLAWYQQKPGKAPKLLIYDASNLESGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SGSGSGTEFTLTISSLQPDDFATYYCQQYDNYWTFGQGTKVEIK
```

Fig. 1 (tiếp)

D

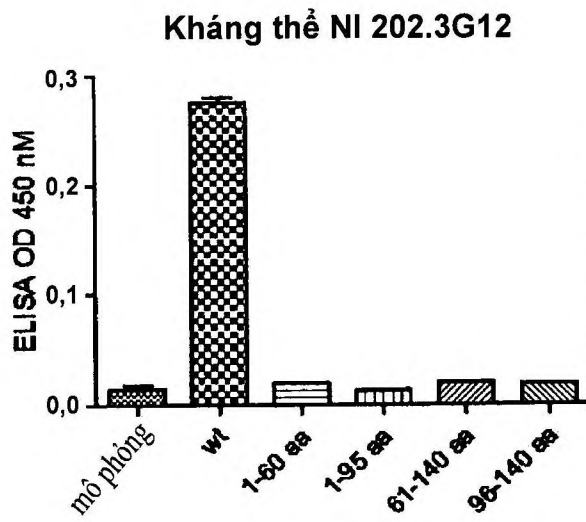
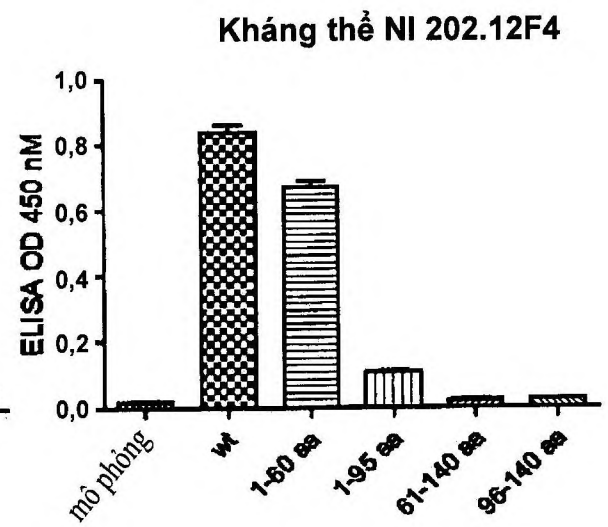
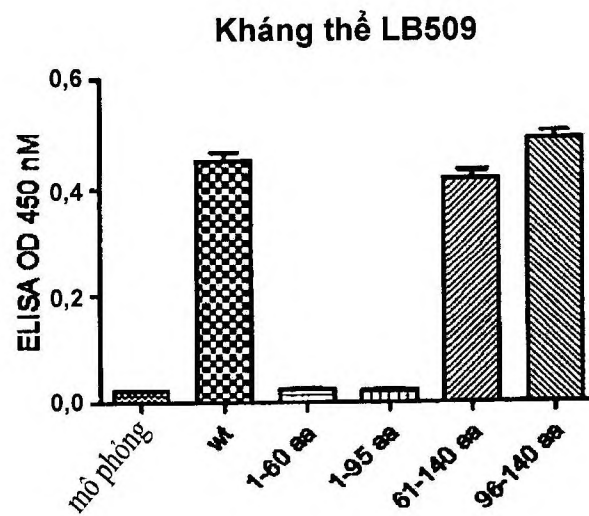
NI-202.3D8-VKc1 (trình tự vùng biến đổi chuỗi nặng VKc1; SEQ ID NO:21)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
EIVMTQSPSSLSASIGDRVTFTCRASHDISNYLAWFRQQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SASGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQYRTYPLTFGQGTRLEIK
```

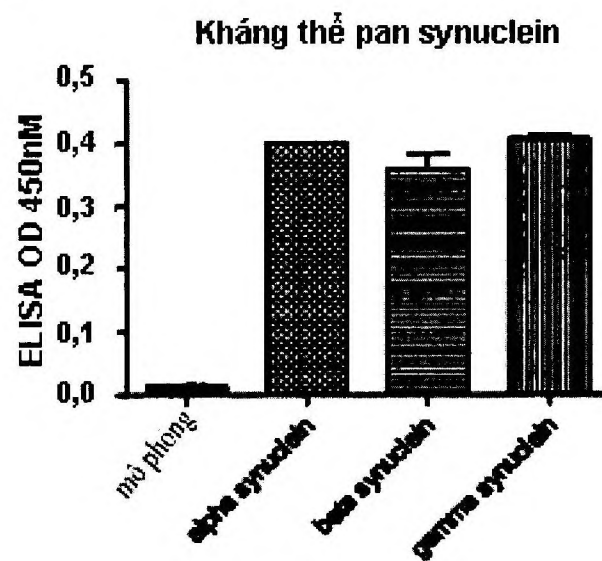
NI-202.3D8-VKc1-GL (trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ VKc1 so với trình tự dòng tế bào gốc; SEQ ID NO: 22)

```
FR1-----CDR1-----FR2-----CDR2---FR3---
DIQMTQSPSSLSASIGDRVTFTCRASHDISNYLAWFRQQPGKAPKSLIYAASSLQSGVPSRF
-----CDR3-----JK-----
SASGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCVQYRTYPLTFGQGTRLEIK
```

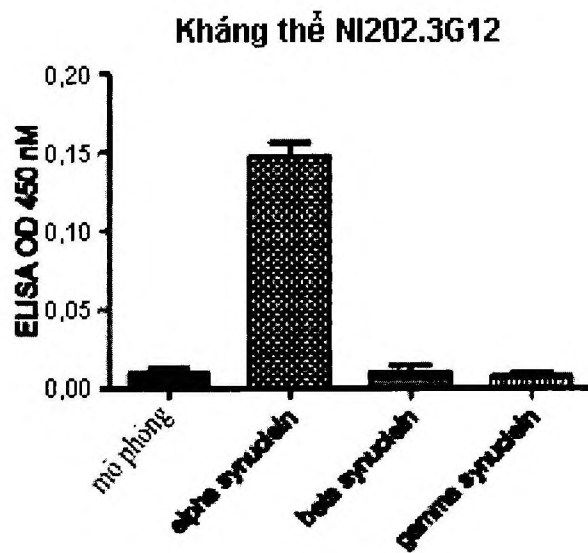
Fig. 1 (tiếp)

A**B****C****Fig. 2**

A



A



B

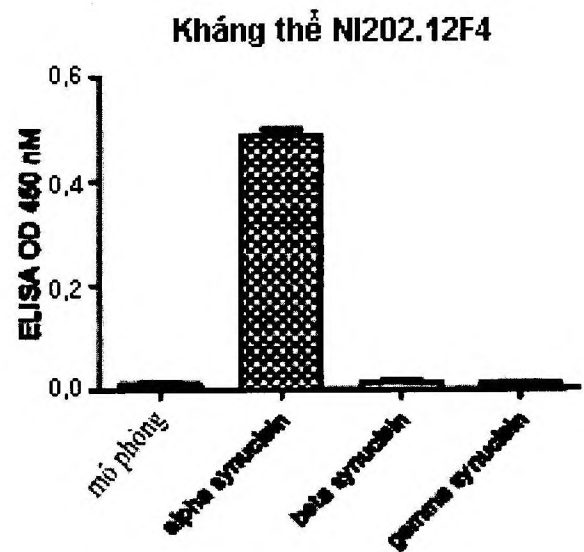
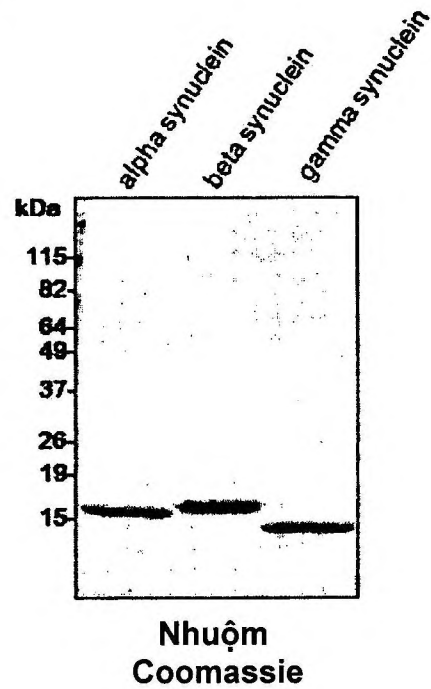
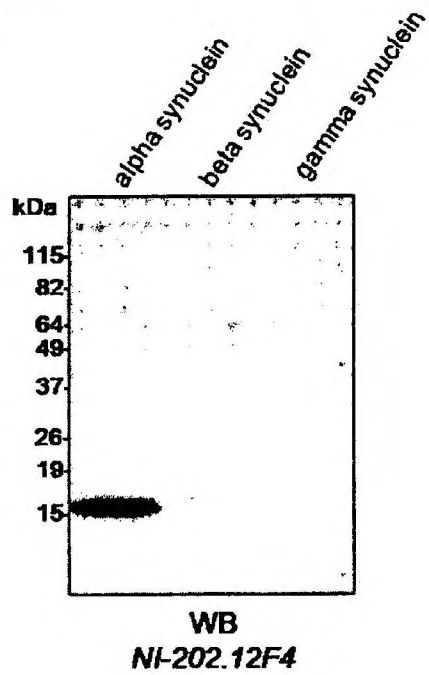
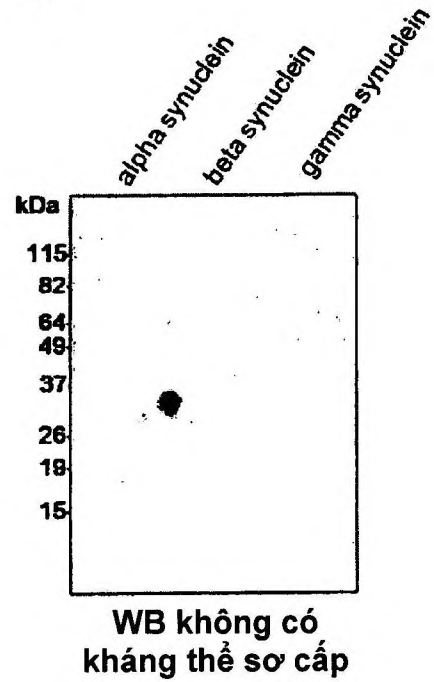


Fig.3

A**B****C****Fig. 4**

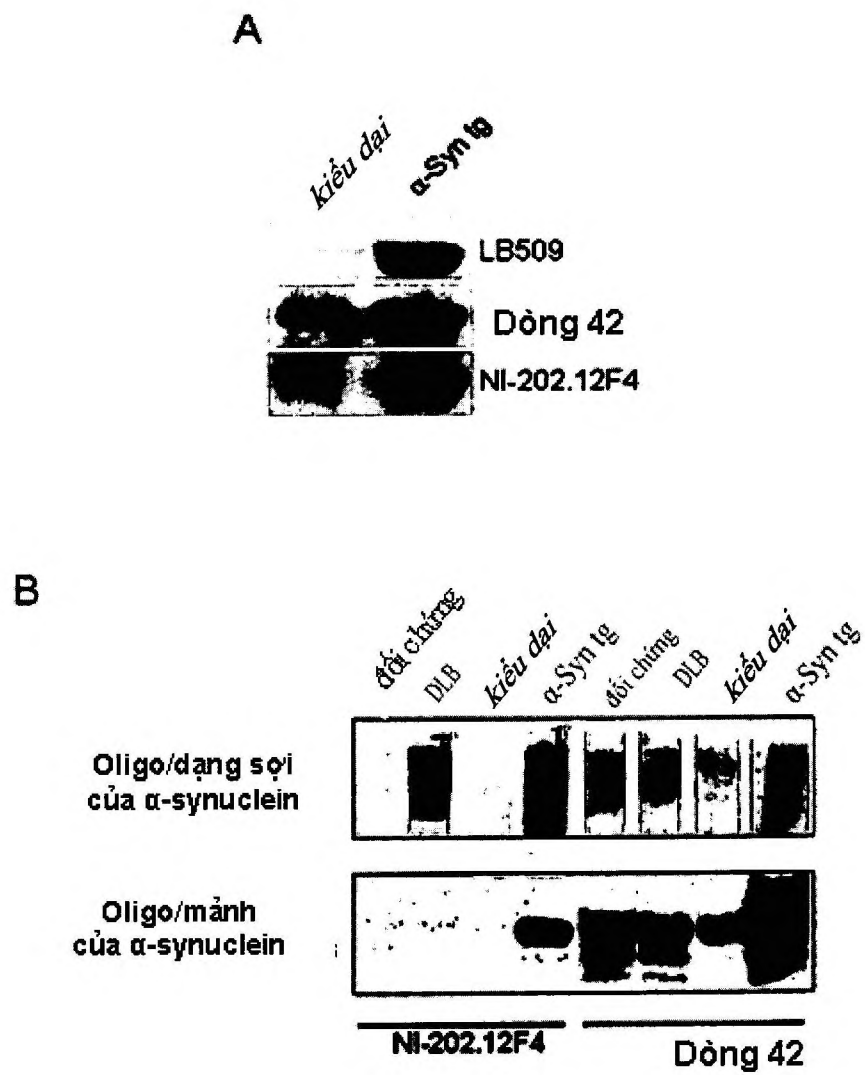


Fig. 5

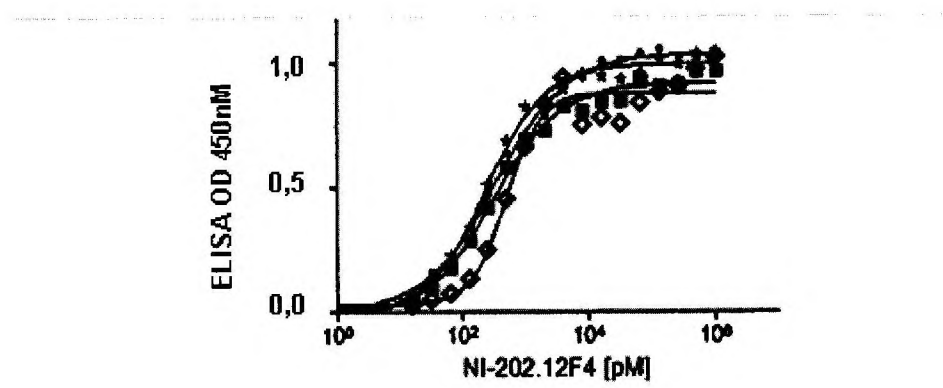


Fig.6

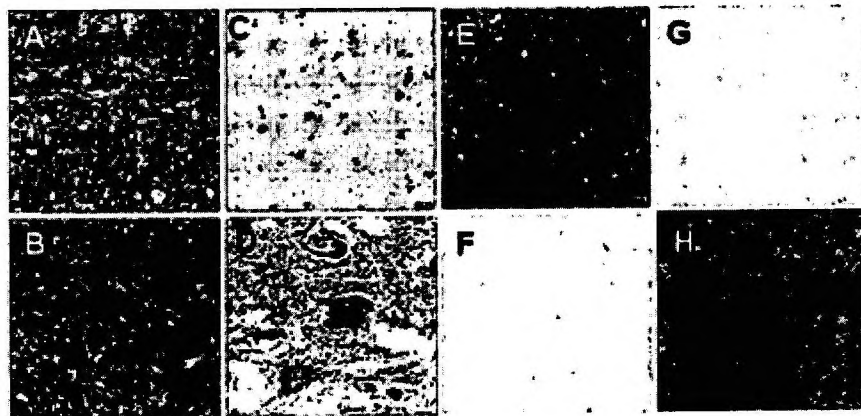


Fig. 7

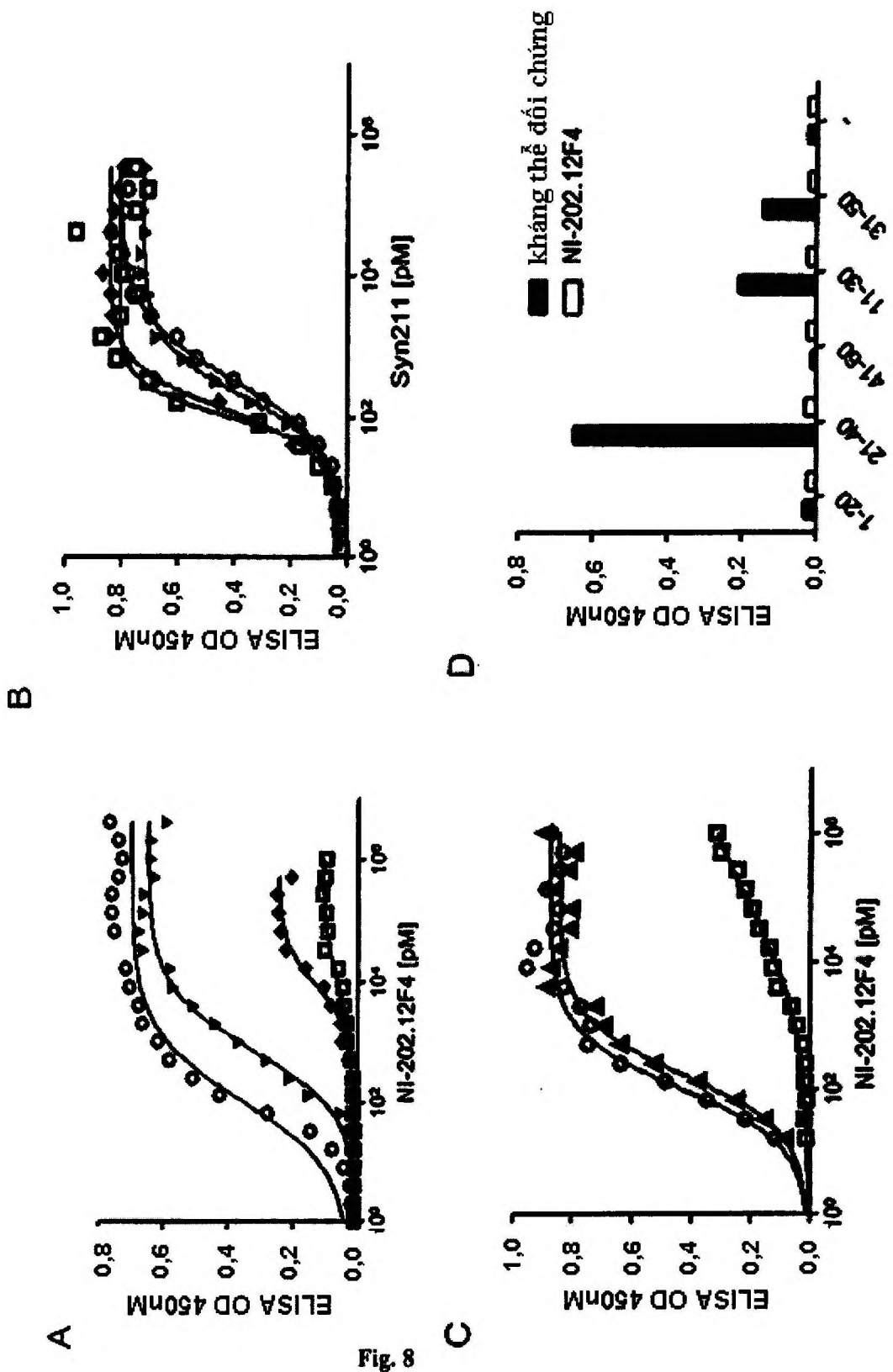
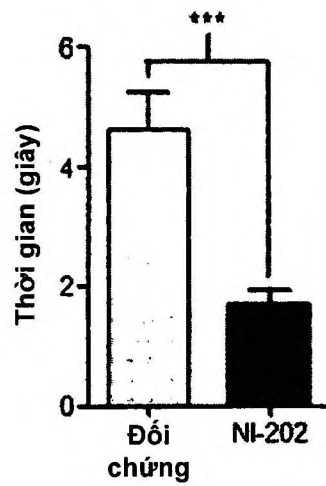


Fig. 8

A

Tturn (thời gian hoạt động)



B

Ttổng (thời gian đi xuống)

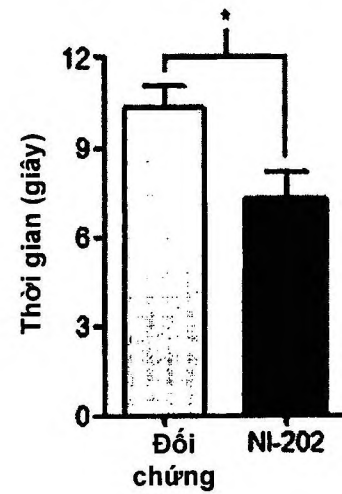
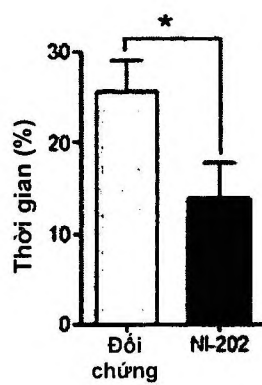
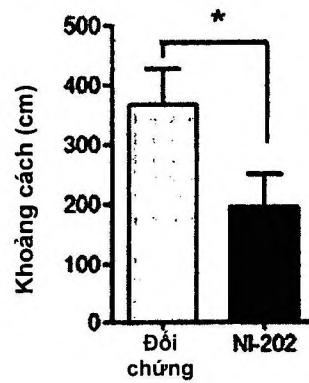


Fig. 9

Thời gian mở



Khoảng cách mở



Tổng khoảng cách

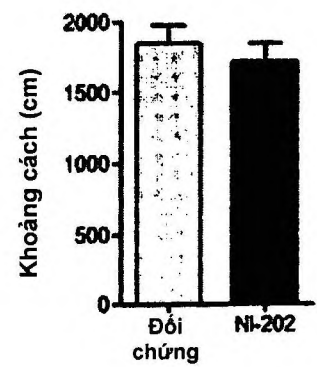


Fig. 10

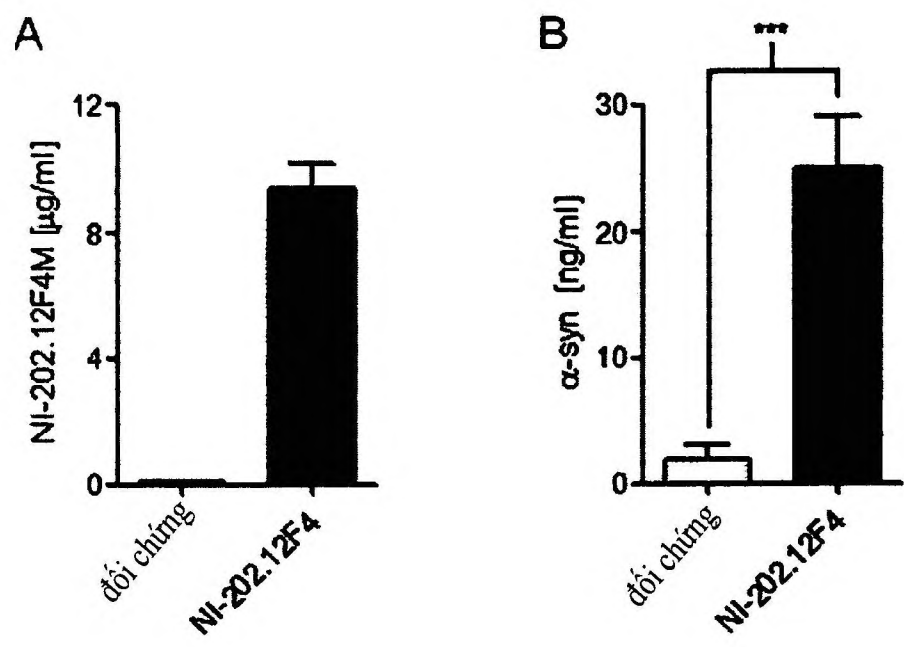


Fig. 11

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Neurimmune Therapeutics AG
 <120> KHÁNG THỂ KHÁNG ALPHA-SYNUCLEIN VÀ PHƯƠNG PHÁP TẠO RA KHÁNG THỂ NÀY
 <130> NE30A27/P-WO
 <150> US 61/139,253
 <151> 19-12-2008
 <150> EP 08 022 188.0
 <151> 19-12-2008
 <160> 22
 <170> PatentIn phiên bản 3.5
 <210> 1
 <211> 140
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(140)
 <223> Trình tự axit amin của alpha-synuclein; ví dụ, xem: Ueda et al, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 90 (1993), 1282-1286; GenBank swissprot: locus SYUA_HUMAN, accession number P37840
 <400> 1
 Met Asp Val Phe Met Lys Gly Leu Ser Lys Ala Lys Glu Gly Val Val
 1 5 10 15
 Ala Ala Ala Glu Lys Thr Lys Gln Gly Val Ala Glu Ala Ala Gly Lys
 20 25 30
 Thr Lys Glu Gly Val Leu Tyr Val Gly Ser Lys Thr Lys Glu Gly Val
 35 40 45
 Val His Gly Val Ala Thr Val Ala Glu Lys Thr Lys Glu Gln Val Thr
 50 55 60
 Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala Val Ala Gln Lys
 65 70 75 80
 Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr Gly Phe Val Lys
 85 90 95
 Lys Asp Gln Leu Gly Lys Asn Glu Glu Gly Ala Pro Gln Glu Gly Ile
 100 105 110
 Leu Glu Asp Met Pro Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Met Pro
 115 120 125
 Ser Glu Glu Gly Tyr Gln Asp Tyr Glu Pro Glu Ala
 130 135 140
 <210> 2
 <211> 363
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

```

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(363)
<223> trình tự vùng biến đổi NI-202.3G12-VHB1 của chuỗi nặng (VH)

<220>
<221> Vùng V
<222> (91)..(105)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Vùng V
<222> (148)..(198)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Vùng V
<222> (295)..(330)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) CDRH3

<220>
<221> Vùng V
<222> (295)..(330)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR3

<400> 2
gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gct gag gtg aag aag ccg ggg gcc      48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ala
1              5              10              15

tca gtg aga ctc tcc tgt agg gct tct gga tac aac ttc atc gac ttc      96
Ser Val Arg Leu Ser Cys Arg Ala Ser Gly Tyr Asn Phe Ile Asp Phe
                20              25              30

cat ata cac tgg gtg cga cag gcc cct gga gag ggg ctt gag tgg atg      144
His Ile His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Glu Gly Leu Glu Trp Met
                35              40              45

ggc tgg agt aat cct caa agt ggc aac tca agt tct gca cag agg ttt      192
Gly Trp Ser Asn Pro Gln Ser Gly Asn Ser Ser Ser Ala Gln Arg Phe
                50              55              60

cag ggc cgg gtc acc atg acc acg gac acg tcc atg tcc gcg gcc tac      240
Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Thr Asp Thr Ser Met Ser Ala Ala Tyr
65              70              75              80

atg gac ctg aac tgg ctg aca ctt gac gac acg gcc gtg tat tac tgt      288
Met Asp Leu Asn Trp Leu Thr Leu Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
                85              90              95

acg aga ccc cat gat ggc gca gga aac tac cga ttt gac acc tgg ggc      336
Thr Arg Pro His Asp Gly Ala Gly Asn Tyr Arg Phe Asp Thr Trp Gly
                100              105              110

cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg      363
Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                115              120

<210> 3
<211> 121
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 3

```

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

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

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

Gly Trp Ser Asn Pro Gln Ser Gly Asn Ser Ser Ser Ala Gln Arg Phe
50 55 60

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

Met Asp Leu Asn Trp Leu Thr Leu Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Pro His Asp Gly Ala Gly Asn Tyr Arg Phe Asp Thr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 4
<211> 121
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(121)
<223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.3G12-VHB1-GL của chuỗi nặng (VH)
được so sánh với trình tự dòng tế bào gốc (GL)

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (31)..(35)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (50)..(66)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (99)..(110)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR3

<400> 4

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

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

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

Gly Trp Ser Asn Pro Gln Ser Gly Asn Ser Ser Ser Ala Gln Arg Phe
50 55 60

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

Met Asp Leu Asn Trp Leu Thr Leu Asp Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

Thr Arg Pro His Asp Gly Ala Gly Asn Tyr Arg Phe Asp Thr Trp Gly
100 105 110

Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 5

<211> 324

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(324)

<223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.3G12-VLc1 của chuỗi nhẹ (VL)

<220>

<221> Vùng V

<222> (67)..(99)

<223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>

<221> Vùng V

<222> (145)..(165)

<223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>

<221> Vùng V

<222> (262)..(294)

<223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 5

cag tct gtg ttg acg cag ccg ccc tcg gtg tca gtg gcc cca gga cag 48
Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ala Pro Gly Gln
1 5 10 15

acg gcc agg atc acc tgc tct ggt gat gcc ttg cca aaa cac tat gct 96
Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys His Tyr Ala
20 25 30

cat tgg tac cag cag aag cca ggc cag gtc cct ata gtg gtc atc tat 144
His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Val Val Ile Tyr
35 40 45

aaa gac act gag agg ccc tca ggg atc cct gag cga ttc tct ggt tcc 192
Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

acc tca ggg aca aca gtc acc ctg acc atc agt ggc gtc cag gca gag 240
Thr Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

gac gag gct cat tat tat tgt caa tca gca gac gtc agt tca act tat 288
Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Val Ser Ser Thr Tyr
85 90 95

gtt gtg ttt ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 324

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 6
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 6

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys His Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Val Val Ile Tyr
35 40 45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Val Ser Ser Thr Tyr
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 7
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<220>
<221> PEPTIT
<222> (1)..(108)
<223> Vùng biến đổi NI-202.3G12-VLc1-GL của chuỗi nhẹ (VL) được so sánh
với trình tự đồng tế bào gốc GL)

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (23)..(33)
<223> vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (49)..(55)
<223> vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>
<221> Dấu hiệu MISC
<222> (88)..(98)
<223> vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 7

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Asp Ala Leu Pro Lys His Tyr Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Val Pro Ile Val Val Ile Tyr
35 40 45

Lys Asp Thr Glu Arg Pro Ser Gly Ile Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Thr Ser Gly Thr Thr Val Thr Leu Thr Ile Ser Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala His Tyr Tyr Cys Gln Ser Ala Asp Val Ser Ser Thr Tyr
85 90 95

Val Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 8

<211> 339

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(339)

<223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.12F4-VHA1b của chuỗi nặng (VL)

<220>

<221> Vùng V

<222> (91)..(105)

<223> vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>

<221> Vùng V

<222> (147)..(204)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>

<221> Vùng V

<222> (301)..(306)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR3

<220>

<221> Dấu hiệu misc

<222> (319)..(339)

<223> Trình tự nucleotit từ vị trí 319 đến 339 có thể đọc theo cách khác là

"tcc cgg gtc acc gtc gcc tca" và mã hóa axit amin

"Ser Arg Val Thr Val Ala Ser"

<400> 8

gag gtg cag ctg gtg cag tct ggg gga ggt ctg gtc gag ccg ggg ggg 48
Glu Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Gly Gly Leu Val Glu Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc cta aga ctc tcc tgt gca gtc tcc gga ttc gat ttc gaa aaa gcc 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Phe Asp Phe Glu Lys Ala
20 25 30

tgg atg agt tgg gtc cgc cag gct cca ggg cag ggg cta cag tgg gtt 144
Trp Met Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Gln Trp Val
35 40 45

gcc cgt atc aag agc aca gct gat ggt ggg aca aca agc tac gcc gcc 192
Ala Arg Ile Lys Ser Thr Ala Asp Gly Gly Thr Thr Ser Tyr Ala Ala

50	55	60	
ccc gtg gaa ggc agg ttc atc atc tca aga gat gat tcg aga aac atg			240
Pro Val Glu Gly Arg Phe Ile Ile Ser Arg Asp Asp Ser Arg Asn Met			
65	70	75	80
ctt tat ctg caa atg aac agt ctg aaa act gaa gac aca gcc gtc tat			288
Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Thr Glu Asp Thr Ala Val Tyr			
	85	90	95
tat tgt aca tca gcc cac tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc			336
Tyr Cys Thr Ser Ala His Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser			
	100	105	110
tcg			339
Ser			

<210> 9
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 9

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

<210> 10
 <211> 113
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(113)
 <223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.12F4-VHA1b-GL của chuỗi nặng (VL)
 được so với trình tự đồng tế bào gốc (GL)

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (31)..(35)
 <223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (50)..(68)
 <223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (101)..(102)
 <223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR3

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (107)..(113)
 <223> Trình tự axit amin từ vị trí 107 đến 113 có thể đọc theo cách khác là "Ser Arg Val Thr Val Ala Ser"

<400> 10

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

Ser

<210> 11
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)
 <223> Trình tự vùng biến đổi chuỗi nhẹ NI-202.12F4-VLa1

<220>
 <221> Vùng V
 <222> (67)..(99)
 <223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>
 <221> Vùng V
 <222> (145)..(165)
 <223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>

<221> Vùng V
 <222> (262)..(294)
 <223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 11
 cag tct gtg ctg act cag cca ccc tcg gtg tca gtg tcc cca gga cag 48
 Gln Ser Val Leu Thr Gln Pro Pro Ser Val Ser Val Ser Pro Gly Gln
 1 5 10 15
 acg gcc agg atc acc tgc tct gga gaa gca ttg cca atg caa ttt gct 96
 Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Met Gln Phe Ala
 20 25 30
 cat tgg tac caa cag agg cca ggc aag gcc cca gtg ata gtg gtg tac 144
 His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Val Ile Val Val Tyr
 35 40 45
 aaa gac agt gag aga ccg tca ggt gtc cct gag cga ttc tct ggc tcc 192
 Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
 50 55 60
 agc tca ggg aca aca gcc acg ttg acc atc act gga gtc cag gca gaa 240
 Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu
 65 70 75 80
 gat gag gct gac tat tac tgc cag tcg cca gac agc act aac act tat 288
 Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Pro Asp Ser Thr Asn Thr Tyr
 85 90 95
 gaa gtc ttc ggc gga ggg acc aag ctg acc gtc cta 324
 Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
 100 105

<210> 12
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

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

<210> 13
 <211> 108
 <212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> PEPTIT

<222> (1)..(108)

<223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.12F4-VLa1-GL của chuỗi nhẹ (VL)
được so sánh với trình tự tế bào gốc (GL)

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (23)..(33)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (49)..(55)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (88)..(98)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 13

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

Thr Ala Arg Ile Thr Cys Ser Gly Glu Ala Leu Pro Met Gln Phe Ala
20 25 30

His Trp Tyr Gln Gln Arg Pro Gly Lys Ala Pro Val Ile Val Val Tyr
35 40 45

Lys Asp Ser Glu Arg Pro Ser Gly Val Pro Glu Arg Phe Ser Gly Ser
50 55 60

Ser Ser Gly Thr Thr Ala Thr Leu Thr Ile Thr Gly Val Gln Ala Glu
65 70 75 80

Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Gln Ser Pro Asp Ser Thr Asn Thr Tyr
85 90 95

Glu Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu
100 105

<210> 14

<211> 369

<212> ADN

<213> Người hiện đại

<220>

<221> CDS

<222> (1)..(369)

<223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.3D8-VHE1 của chuỗi nặng (VH)

<220>

<221> Vùng V

<222> (91)..(105)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>

<221> Vùng V

<222> (148)..(198)

<223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>

<221> Vùng V

<222> (295)..(336)

<223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VH-CDR3

<400> 14

gag gtg cag ctg gtg gag tct ggg gga ggc gtg gtc cag cct ggg agg 48
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Val Val Gln Pro Gly Arg
1 5 10 15

tcc ctg aga ctc tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt acc tat 96
Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Thr Tyr
20 25 30

gcc att tcc tgg gtc cgc cag gct cca ggc aag ggg ctg gag tgg gtg 144
Ala Ile Ser Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca att att tca aat gat gga agt cgt aaa tat tat gca gac tcc gtg 192
Ala Ile Ile Ser Asn Asp Gly Ser Arg Lys Tyr Tyr Ala Asp Ser Val
50 55 60

aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat tcc agg gac acg ctg gat 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Arg Asp Thr Leu Asp
65 70 75 80

ctg gaa atg aac agc ctg aga gat gag gac acg gct gtg tat tac tgt 288
Leu Glu Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
85 90 95

gcg aaa aaa cga ggg acg tat gcc agc agg tgc aaa gcc ttt gac ttc 336
Ala Lys Lys Arg Gly Thr Tyr Ala Ser Arg Cys Lys Ala Phe Asp Phe
100 105 110

tgg ggc cag gga acc ctg gtc acc gtc tcc tcg 369
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 15

<211> 123

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<400> 15

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Lys Arg Gly Thr Tyr Ala Ser Arg Cys Lys Ala Phe Asp Phe
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 16
 <211> 123
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<220>
 <221> PEPTIT
 <222> (1)..(123)
 <223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.3D8-VHE1-GL của chuỗi nặng (VH)
 được so sánh với trình tự đồng tế bào gốc (GL)

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (31)..(35)
 <223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VH-CDR1

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (50)..(66)
 <223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VH-CDR2

<220>
 <221> Dấu hiệu MISC
 <222> (99)..(112)
 <223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VH-CDR3

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Ala Lys Lys Arg Gly Thr Tyr Ala Ser Arg Cys Lys Ala Phe Asp Phe
 100 105 110

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 17
 <211> 318
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(318)
 <223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.3D8-VKa1 của chuỗi nhẹ (VL)

<220>
 <221> Vùng V
 <222> (70)..(102)
 <223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>
 <221> Vùng V
 <222> (148)..(168)
 <223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>
 <221> Vùng V
 <222> (265)..(288)
 <223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 17
 gac atc cag ttg acc cag tct cct tcc acc ctg tct gca tct gta gga 48
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac aga gtc acc atc act tgc cgg gcc agt cag agt att agt ggc tgg 96
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Trp
 20 25 30
 ttg gcc tgg tat cag cag aaa cca ggg aaa gcc cct aag ctc ctg atc 144
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tat gat gcc tcc aat ttg gaa agt ggg gtc cca tca agg ttc agc ggc 192
 Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gaa ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag cct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
 65 70 75 80
 gat gat ttt gca act tat tat tgc caa cag tat gat aat tat tgg acg 288
 Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Trp Thr
 85 90 95
 ttc ggc caa ggg acc aag gtg gaa atc aaa 318
 Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105

<210> 18
 <211> 106
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 18
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Thr Leu Ser Ala Ser Val Gly
 1 5 10 15
 Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Trp
 20 25 30
 Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 19

<211> 106

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> PEPTIT

<222> (1)..(106)

<223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.3D8-VKa1-GL của chuỗi nhẹ (VL)
được so với trình tự đồng tế bào gốc (GL)

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (24)..(34)

<223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (50)..(56)

<223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (89)..(96)

<223> Vùng xác định hỗ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 19

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Gly Trp
20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
35 40 45

Tyr Asp Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Asp Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Tyr Asp Asn Tyr Trp Thr
85 90 95

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 20

<211> 321

<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(321)
<223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.3D8-VKc1 của chuỗi nhẹ (VL)

<220>
<221> Vùng V
<222> (70)..(102)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>
<221> Vùng V
<222> (148)..(168)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>
<221> Vùng V
<222> (265)..(291)
<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 20
gaa att gtg atg acg cag tct cca tcc tca ctg tct gca tct att gga 48
Glu Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Ile Gly
1 5 10 15

gac aga gtc acc ttc act tgt cgg gcg agt cac gac att agc aat tat 96
Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

tta gcc tgg ttt cgg cag caa cca ggg aaa gcc cct aag tcc ctg atc 144
Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

tat gct gca tct agt ctg caa agt ggg gtc cca tca aga ttc agc gcc 192
Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

agt gga tct ggg aca gac ttc act ctc acc atc agc agc ctg cag ccc 240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

gaa gat ttt gca act tat tat tgt gtt caa tat agg act tac ccc ctc 288
Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

acc ttc ggc caa ggg aca cga ctg gag att aaa 321
Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 21
<211> 107
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 21

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

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105

<210> 22

<211> 107

<212> PRT

<213> Người hiện đại

<220>

<221> PEPTIT

<222> (1)..(107)

<223> Trình tự vùng biến đổi NI-202.3D8-VKc1-GL của chuỗi nhẹ (VL) được so sánh với trình tự đồng tế bào gốc (GL)

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (24)..(34)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR1

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (50)..(56)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR2

<220>

<221> Dấu hiệu MISC

<222> (89)..(97)

<223> Vùng xác định bổ trợ (CDR) VL-CDR3

<400> 22

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

Asp Arg Val Thr Phe Thr Cys Arg Ala Ser His Asp Ile Ser Asn Tyr
20 25 30

Leu Ala Trp Phe Arg Gln Gln Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ser Leu Ile
35 40 45

Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Gln Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Ala
50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Val Gln Tyr Arg Thr Tyr Pro Leu
85 90 95

Thr Phe Gly Gln Gly Thr Arg Leu Glu Ile Lys
100 105