بسم الله الرحمن الرحيم

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

المملكة العربية السعودية

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

إن المشرف العام على مكتب البراءات السعودي، وبموجب أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية الصادر بالمرسوم الملكي الكريم رقم م/٢٧ وتاريخ ١٤٢٥/٠٥/٢٩هـ، واستناداً لأحكام اللائحة التنفيذية له الصادرة بالقرار الإداري رقم ٣٦٠٧٣٢٩-٢-١٦١ وتاريخ ١٤٣٦/١٢/٣٠ هـ، يقرر منح:

بروثينا بيوساينسيز ليمتد

Prothena Biosciences Limited

براءة اختراع رقم ٥٢١٨

بتاريخ ١٤٣٨/٠٥/٠٨هـ الموافق ٢٠١٧/٠٢/٠٥ م

عن الاختراع المسمى/ أجسام مضادة مُميزة لألفا سينوكلين

Antibodies recognizing alpha-synuclei

ولمالك البراءة الحق في الانتفاع بكامل الحقوق التي يمنحها النظام في المملكة العربية السعودية.

المشرف العام على مكتب البراءات السعودي

م. سامي بن علي السديس

مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية KACST

[19] **المملكة العربية السعودية** SA
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية

[11] **رقم البراءة:** ٥٢١٨
[45] **تاريخ المنح:** ١٤٣٨/٠٥/٠٨ هـ
الموافـــق: ٢٠١٧/٠٢/٠٥ م

[12] براءة اختراع

[72] **اسـم المخـترع:** روبـين بـاربور، كبـت دور جيمس ثيـل، تارلوشان اس نيجار

[73] **مـالك البراءة :** بروثينا بيوساينسيز ليمتد
عنوانه: ٢٥ -٢٨ نورث وال كواي، دوبلين، ايرلندا
جنسيته: ايرلندية

[74] **الوكيل:** مكتب المحامي سليمان ابراهيم العمار

[21] **رقم الطلب:** ٥١٥٣٦٠٢٥٣

[22] **تاريخ دخول المرحلة الوطنية:** ١٤٣٦/٠٦/١٩ هـ
الموافق : ٢٠١٥/٠٤/٠٨ م
تاريخ الإيداع للطلب الدولي: ٢٠١٣/١٠/٠٨ م

[86] **رقم الطلب الدولي:** PCT/US2013/063945
[87] **رقم النشر الدولي:** WO/2014/058924
تاريخ النشر الدولي: ٢٠١٤/٠٤/١٧م

[30] **بيانات الأسبقية:**

US	٦١/٧١١,٢٠٤	٢٠١٢/١٠/٠٨م
US	٦١/٧١٩,٢٨١	٢٠١٢/١٠/٢٦م
US	٦١/٨٤٠,٤٣٢	٢٠١٣/٠٦/٢٧م
US	٦١/٨٧٢,٣٦٦	٢٠١٣/٠٨/٣٠م

[51] **التصنيف الدولي** (IPC[8]) :
C07K 016/018, A61K 049/004, A61K 049/000

[56] **المراجع:**
CHOI JY ET AL: "Fine epitope mapping of monoclonal antibodies specific to human alpha-synuclein." Neuroscience Letters, vol. 397 , (2006), pages 53-58

WO	٢٠٠٥٠٤٧٨٦٠	٢٠٠٥/٠٥/٢٦ م
US	٢٠٠٨٠١٤١٩٤	٢٠٠٨/٠١/١٧ م

اسم الفاحص: ماجد بن غرم الله الغامدي

[54] **اسم الاختراع:** أجسام مضادة مُميزة لألفا سينوكلين
Antibodies recognizing alpha-synuclei

[57] **الملخص:** يتعلق الاختراع الحالي بتوفير جسم مضاد أحادي النسيلة 5C1 monoclonal antibody وأجسام مضادة ذات صلة. يرتبط الجسم المضاد 5C1 بقمة لاصقة داخل الوحدات البنائية residues ١١٨-١٢٦ لـ α – سينوكلين α-synuclein. تكون الأجسام المضادة للاختراع نافعة، على سبيل المثال، لعلاج و/ أو تشخيص اضطرابات مرتبطة بـ α - سينوكلين، على وجه التحديد تراكم رواسب α – سينوكلين. تتضمن تلك الاضطرابات أمراض جسم ليوي Lewy body diseases، مثل مرض باركنسون Parkinson's disease، مرض جسم ليوي منتشر Diffuse Lewy Body Disease (DLBD)، صورة متغيرة لجسم ليوي Lewy body variant (LBV) من مرض الزهايمر Alzheimer's disease، مرض والزهايمر وباركنسون المدمج، قصور ذاتي مفرد وضمور الجهاز المتعدد multiple system atrophy (MSA).

عدد عناصر الحماية (٣٧)، عدد الأشكال (٩)

أجسام مضادة مُميزة لألفا سينوكلين

Antibodies recognizing alpha-synuclein

الوصف الكامل

خلفية الاختراع

تكون مسببات المرض سينوكلين، أيضاً معروفة بأمراض جسم ليوي Lewy body diseases (LBDs)، وتتسم بتنكس الجهاز الدوباميني dopaminergic system، تغيرات الحركة motor alterations، قصور إدراكي cognitive impairment، وتكوين أجسام ليوي Lewy bodies (LBs) و/ أو مِحوار ليوي Lewy neurites. (McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). تتضمن مسببات المرض سينوكلين Synucleinopathies مرض باركنسون (Parkinson's disease بما في ذلك مرض باركنسون مجهول السبب idiopathic Parkinson's disease)، مرض جسم ليوي المنتشر Diffuse Lewy Body Disease (DLBD) المعروف أيضاً بالعتة المصاحب لأجسام ليوي Dementia with Lewy Bodies (DLB)، صورة متغيرة لجسم ليوي لمرض الزهايمر Lewy body variant of Alzheimer's disease (LBV)، مرض الزهايمر وباركنسون المشترك Combined Parkinson، القصور الذاتي المفرد pure autonomic failure وضمور الجهاز المتعدد multiple system atrophy (MSA) (MSA؛ مثل، ضمور زيتوني جسري مخيخي Olivopontocerebellar Atrophy، تنكس مخططي سودائي Striatonigral Degeneration ومتلازمة شاي-دريجر Shy-Drager Syndrome). يتضح أن العديد من الأعراض والعلامات غير الحركية عبارة عن منذرات بمسببات مرض سينوكلين synucleinopathies في الدور البادري للأمراض diseases prodromal phase (مثل، السابق للأعراض، دون الإكلينيكي subclinical، الإكلينيكي الأولي preclinical، أو الفترة الأمام حركية premotor period). تتضمن العلامات المبكرة المذكورة، على سبيل المثال:

اضطراب سلوك النوم REM sleep behavior disorder (RBD)، فقد حاسة الشم والإمساك (Mahowald et al., Neurology (2010) 75:488-489). تستمر أمراض جسم ليوي

Lewy body diseases في أن تكون السبب المشترك لاضطرابات الحركة والتدهور الإدراكي في مجموعة من كبار السن (Galasko et al., Arch. Neurol. (1994) 51:888-95).

تكون α-سينوكلين عبارة عن جزء من عائلة كبيرة من البروتينات التي تتضمن β- و γ- سينوكلين synuclein - وسينوريتين synoretin. يتم التعبير عن α-سينوكلين الحالة العادية المرتبطة الوصلات العصبية synapses ويتضح أنه يلعب دوراً هاماً في الليونة العصبية neural plasticity، التعلم والذاكرة. استخدمت العديد من الدراسات α-سينوكلين الذي يكون له دوراً مركزياً في مسببات مرض باركنسون PD. يمكن أن يتكتل البروتين لتشكيل ألياف غير قابلة للذوبان في الحالات المسببة للمرض. على سبيل المثال، يتراكم سينوكلين في أجسام ليوي LBs:

(Spillantini et al., Nature (1997) 388:839-40; Takeda et al., J. Pathol. (1998) 152:367-72; Wakabayashi et al., Neurosci. Lett. (1997) 239:45-8).

يتم عزل الطافرات mutations التي تحدث في جين α-سينوكلين synuclein gene - بصورة مشتركة في الصور العائلية النادرة لداء باركنسون :

(Kruger et al., Nature Gen. (1998) 18:106-8; Polymeropoulos, et al., Science (1997) 276:2045-7).

تؤدي زيادة التعبير الوراثي عن α-سينوكلين في فئران متحورة وراثياً transgenic mice:

وذبابة الندى drosophila (Masliah et al., Science (2000) 287:1265-9) :

(Feany et al., Nature (2000) 404:394-8) إلى محاكاة العديد من الجوانب المسببة للمرض لمرض جسم ليوي. بالإضافة إلى ذلك، يتضح أن الأوليجومرات القابلة للذوبان soluble oligomers من سينوكلين يمكن أن تكون سامة للأعصاب (:

(Conway et al., Proc Natl Acad Sci USA (2000) 97:571-576; Volles et al., J. Biochem. (2003) 42:7871-7878).

يقترح تراكم α-سينوكلين التي يكون لها نفس التغييرات الشكلية والعصبية في الأنواع والنماذج الحيوانية بصورة متنوعة مثل الكائنات البشرية، الفئران، والحشرات أن هذا الجزيء molecule يساهم في تطور مرض جسم ليوي.

الوصف العام للاختراع

يوفر الاختراع جسم مضاد أحادي النسيلة يتضمن سلسلة خفيفة كما تم التحديد بواسطة Kabat وثلاث سلاسل ثقيلة كما تم التحديد بواسطة Kabat لجسم مضاد أحادي النسيلة 5C1، شريطة أن يكون لكل من غير ما يصل إلى أربع عمليات حذف، عمليات إدخال أو عمليات استبدال، ويمكن أن تتضمن ما يصل إلى ست عمليات حذف، عمليات إدخال أو عمليات استبدال. يكون 5C1 عبارة عن جسم مضاد فأري يتميز بوجود منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة بها متوالية حمض أميني تشتمل على متوالية رقم : ٩ ومنطقة متغيرة خفيفة السلسلة بها متوالية حمض أميني تشتمل على متوالية رقم :٢٤. بشكل اختياري، يتضمن الجسم المضاد ثلاث سلاسل خفيفة كما تم التحديد بواسطة Kabat وثلاث سلاسل ثقيلة كما تم التحديد بواسطة Kabat لجسم مضاد أحادي النسيلة 5C1. بشكل اختياري، يكون الجسم المضاد أحادي النسيلة عبارة عن صورة متوافقة مع البشر، خيمرية، مكسوة لجسم مضاد أحادي النسيلة 5C1. بشكل اختياري، يكون الجسم المضاد عبارة عن شظية Fab، أو سلسلة مفردة Fv. بشكل اختياري، يتضمن الجسم المضاد نمط متماثل بشري. بشكل اختياري، يتضمن الجسم المضاد نمط متماثل بشري أو نمط متماثل.

يوفر الاختراع جسم مضاد يشتمل على منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة ناضجةبها متوالية حمض أميني متطابقة بنسبة ٩٠٪ مع H4 (متوالية رقم :١٧) ومنطقة متغيرة خفيفة السلسلة ناضجة بها متوالية حمض أميني متطابقة بنسبة ٩٠٪ مع L3 (متوالية رقم :٣١)، حيث يرتبط الجسم المضاد على وجه التحديد بألفا سينوكلين بشري. تشتمل بعض الأجسام المضادة المذكورة على ثلاث Kabat لمتوالية رقم :٩ وثلاث Kabat لمتوالية رقم :٢٤. في بعض الأجسام المضادة يتم شغل واحد على الأقل من المواضع،،،، بـ L،Y ،T ،I ، وK ، على التوالي، ويتم شغل واحد على الأقل من المواضع و بواسطة S. في بعض الأجسام المضادة يتم شغل المواضع و بواسطة L،Y ،T ،I ، وK، على التوالي، ويتم شغل المواضع بواسطة S. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل واحد على الأقل من المواضع ، بواسطة A،L ،F ، وS، على التوالي. في

بعض الأجسام المضادة، يتم شغل المواضع و بواسطة L،A ، وS، على التوالي. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل الموضع بواسطة S. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل واحد على الأقل من المواضع ، بواسطة N، K،V ، وF، على التوالي. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل المواضع بواسطة N،V ، وF، على التوالي. تشتمل بعض الأجسام المضادة على منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة ناضجة بها متوالية حمض أميني متطابقة بنسبة ٩٥٪ على الأقل مع (متوالية رقم :١٧) ومنطقة متغيرة خفيفة السلسلة ناضجة متطابقة بنسبة ٩٥٪ على الأقل مع (متوالية رقم :٣١). في بعض الأجسام المضادة توجد أي اختلافات في للمنطقة المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة الناضجة و المنطقة المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة الناضجة من (متوالية رقم :S ١٧ و ٣١، على التوالي) في المواضع.

تشتمل بعض الأجسام المضادة على منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة ناضجة بها متوالية حمض أميني تسمى (متوالية رقم :١٧) ومنطقة متغيرة ذات سلسلة خفيفة ناضجة بها متوالية حمض أميني تسمى L3 (متوالية رقم :٣١). تشتمل بعض الأجسام المضادة على منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة ناضجة بها متوالية حمض أميني تسمى H5 (متوالية رقم :١٨) ومنطقة متغيرة ذات سلسلة خفيفة ناضجة بها متوالية حمض أميني تسمى L3 (متوالية رقم :٣١).

في أي من الأجسام المضادة السابقة، يكون للجسم المضاد طافرة واحدة على الأقل في المنطقة الثابتة. بشكل اختياري، تؤدي الطافرة إلى تقليل التثبيت المتمم أو التنشيط بواسطة المنطقة الثابتة. بشكل اختياري، يكون للجسم المضاد طافرة عند واحد أو أكثر من المواضع ٢٤١، ٢٦٤، ٢٦٥، ٢٧٠، ٢٩٦، ٢٩٧، ٣٢٢، ٣٢٩ و ٣٣١ بواسطة ترقيم الاتحاد الأوروبي EU. بشكل اختياري، يتضمن الجسم المضاد ألانين عند المواضع ٣١٨، ٣٢٠ و ٣٢٢.

في أي من الأجسام المضادة السابقة، يمكن دمج منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة ناضجة مع منطقة ثابتة ذات سلسلة ثقيلة ويمكن دمج منطقة ثابتة ذات سلسلة خفيفة ناضجة مع منطقة ثابتة خفيفة السلسلة.

في أي من الأجسام المضادة السابقة، يمكن أن تكون المنطقة الثابتة ثقيلة السلسلة في صورة طافرة للمنطقة الثابتة البشرية الطبيعية والتي يكون لها ارتباط منخفضة بمستقبل Fcγ بالنسبة لمنطقة ثابتة بشرية طبيعية.

في أي من الأجسام المضادة السابقة، يمكن أن تكون المنطقة الثابتة ثقيلة السلسلة عبارة عن نمط متماثل من بشري. في بعض الأجسام المضادة يكون النمط المتغاير عبارة في بعض الأجسام المضادة، يكون النمط المتغاير عبارة عن.

يوفر الاختراع أيضاً طريقة لجعل الجسم المضاد متوافق مع البشر، تشتمل على تحديد متواليات من المناطق المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة والثقيلة لجسم مضاد فأري mouse antibody 5C1، تخليق حمض نووي مُشفر nucleic acid encoding synthesizing لسلسلة ثقيلة متوافقة مع البشر تشتمل على لجسم مضاد فأري ثقيل السلسلة وحمض نووي مُشفر لسلسة خفيفة متوافقة مع البشر تشتمل على لجسم مضاد فأري خفيف السلسلة، والتي تعبر عن الأحماض النووية في خلية عائلة host cell لإنتاج جسم مضاد متوافق مع البشر humanized antibody.

يوفر الاختراع أيضاً طريقة لإنتاج صورة متوافقة مع البشر، خيمرية، مكسوة للجسم المضاد 5C1، تشتمل على زراعة خلايا متحولة باستخدام أحماض نووية مُشفرة للسلاسل الثقيلة والخفيفة للجسم المضاد، بحيث تعمل الخلية على إفراز الجسم المضاد؛ و تنقية الجسم المضاد من أوسام مزرعة الخلية.

يوفر الاختراع أيضاً طريقة لإنتاج سلالة خلية تنتج صورة متوافقة مع البشر، خيمرية، مكسوة للجسم المضاد 5C1، تشتمل على إدخال ناقل مُشفر لسلاسل خفيفة وثقيلة للجسم المضاد ومرقم تم اختياره داخل خلايا؛ نشر الخلايا في هذه الظروف لاختيار الخلايا التي يكون لها عدد نسخة متزايد من الناقل؛ عزل الخلايا المفردة عن الخلايا التي تم اختيارها؛ والخلايا المحفوظة في بنك الجينات GenBank المستنسخة banking cells cloned من خلية مفردة تم اختيارها على أساس ناتج الجسم المضاد. تشتمل بعض من تلك الطرق أيضاً على نشر الخلايا في ظروف انتقائية وفحص سلالات الخلية التي تعبر وراثياً بصورة طبيعية و تُفرز ١٠٠ مجم/لتر/١٠ ٦ خلية/٢٤ ساعة على الأقل.

يوفر الاختراع أيضاً تركيبة صيدلانية pharmaceutical composition تشتمل على أي من الأجسام المضادة المذكورة سابقاً.

يوفر الاختراع أيضاً طريقة لعلاج أو الوقاية من مرض جسم ليوي تشتمل إعطاء نظام فعال لأي من الأجسام المضادة المذكورة سابقاً وكذلك معالجة أو الوقاية من المرض.

يوفر الاختراع أيضاً طريقة لتقليل تكوين جسم ليوي في مريض يعاني من أو معرض لخطورة الإصابة بمرض جسم ليوي، تشتمل على إعطاء المريض كمية فعالة من أي من الأجسام المضادة المذكورة سابقاً.

يوفر الاختراع أيضاً طريقة لعلاج مرض يعاني من أو معرض لخطر الإصابة بمرض جسم ليوي، تشتمل على إعطاء المريض نظام فعال من أي من الأجسام المضادة المذكورة سابقاً. في بعض الطرق، يكون المرض عبارة عن مرض باركنسون. في بعض الطرق، يكون المرض عبارة عن اضطراب سلوك النوم REM(RBD). في بعض الطرق، يكون المرض عبارة عن العتة المصاحب لأجسام ليوي (DLB) أو ضمور النظام المتعدد (MSA). في بعض الطرق، يتم تثبيط انخفاض الوظائف الإدراكية في المريض. في بعض الطرق، يتم تقليل نواتج التكتل المتعلقة بالتهاب الأعصاب و/ أو ألفا سينوكلين محوري عصبي. في بعض الطرق، يتم تقليل الضمور المتعلق بالتهاب الأعصاب في المريض. في بعض الطرق، يتم الحفاظ على الكثافة التشابكية و/ أو التغصنية. في بعض الطرق، تحافظ الطريقة على سينباتوفيسين و/ أو MAP2 في المريض.

يوفر الاختراع أيضاً طريقة لتثبيط تكتل سينوكلين inhibiting synuclein aggregation أو تقليل أجسام ليوي أو نواتج تكتل سينوكلين في مريض يعاني من أو معرض لخطورة الإصابة بمرض جسم ليوي، تشتمل على إعطاء المريض كمية فعالة من جسم مضاد كما تم التحديد بواسطة أي من الأجسام المضادة المذكورة سابقاً. في بعض من تلك الطرق، يكون المرض عبارة عن مرض باركنسون. في بعض الطرق، يتم تثبيط انخفاض الوظائف الإدراكية في المريض. في بعض الطرق، يتم تقليل نواتج التكتل المتعلقة بالتهاب الأعصاب neuritic و/ أو نواتج تكتل ألفا سينوكلين محوري عصبي axonal alpha synuclein aggregates . في بعض الطرق، يتم تقليل الضمور المتعلق بالتهاب الأعصاب neuritic dystrophy في المريض. في بعض الطرق،

يتم الحفاظ على الكثافة التشابكية synaptic density و/ أو التغصنية dendritic. في بعض الطرق، تحافظ الطريقة على سينباتوفيسين synaptophysin و/ أو MAP2 في المريض.

يوفر الاختراع أيضاً طريقة للكشف عن أجسام ليوي في مريض يعاني من أو معرض لخطورة الإصابة بمرض جسم ليوي، تشتمل على إعطاء المريض كمية فعالة من أي من من الأجسام المضادة المذكورة سابقاً، حيث يرتبط الجسم المضاد بأجسام ليوي؛ و الكشف عن جسم مضاد مرتبط في المريض. بشكل اختياري، يكون الجسم المضاد مرقماً.

يوفر الاختراع أيضاً حمض نووي معزول isolated nucleic acid، ناقل أو نواقل، و خلايا عائلة مناسبة لتشفير أي من الأجسام المضادة المذكورة سابقاً.

<u>شرح مختصر للرسومات</u>

شكل ١ يوضح متواليات الحمض الأميني لمنطقة متغيرة ناضجة ذات سلسلة ثقيلة 5C1 فأرية. تكون مناطق تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) وفقاً لتعريف Kabat تحتها خط ومكتوبة بخط عريض.

شكل ٢ يوضح متواليات الحمض الأميني لمنطقة متغيرة ناضحة ذات سلسلة خفيفة5C1 فأري. يتم وضع خط تحت مناطق تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) وفقاً لتعريف Kabat و كتابتها بخط عريض.

شكل ٣ يوضح نتائج العلاج المناعي السلبي passive immunotherapy باستخدام تأثير 5C1 على أداء الذاكرة في جزء فحص لاختبار متاهة في الماء وفقاً لـ Morris.

شكل ٤ يوضح نتائج العلاج المناعي السلبي لتأثير 5C1 على سرعة و الأخطاء في اختبار حزمة مستديرة round beam test.

شكل ٥ يوضح نتائج اختبار فحص الأنزيم المرتبط مناعياً ELISA على ألفة الأجسام المضادة 5C1 المتوافقة مع البشر المختلفة.

شكل ٦ يوضح نتائج تجربة تطفير فحص الألانين alanine scanning mutagenesis experiment المستخدمة لتحديد القمة اللاصقة لـα -سينوكلين المرتبط بواسطة الجسم المضاد 9E4. يوضح الجزء العلوي للشكل بقع ويسترن Western blotts لـα -سينوكلين تام الطول length -synuclein (طافرات نقطة point mutations النمط البري أو الفردية للوحدات البنائية ١١٨-١٢٦، كما تمت الإشارة) المبقعة باستخدام الجسم المضاد 9E4 (لوحة يسرى) أو جسم مضاد للمقارنة 1H7 (لوحة يمنى). يوضح الجزء السفلي للشكل القمة اللاصقة لـα - سينوكلين المرتبط بواسطة الجسم المضاد 9E4.

شكل ٧ يوضح نتائج تجربة تطفير فحص الألانين المستخدمة لتحديد القمة اللاصقة لـα - سينوكلين المرتبط بواسطة الجسم المضاد 5C1. يوضح الجزء العلوي للشكل بقع ويسترن لـ α- سينوكلين تام الطول (طافرات نقطة النمط البري أو الفردية في الوحدات البنائية ١١٨-١٢٦، كما تمت الإشارة) المبقعة باستخدام جسم مضاد 5C1(لوحة يسرى) أو جسم مضاد للمقارنة 1H7 (لوحة يمنى). يوضح الجزء السفلي للشكل القمة اللاصقة لـα -سينوكلين المرتبط بواسطة الجسم المضاد 5C1.

شكل ٨ يوضح نتائج of تجربة تطفير فحص الألانين المستخدم لتحديد القمة اللاصقة لـα - سينوكلين المرتبط بواسطة الجسم المضاد 5D12. يوضح الجزء العلوي للشكل بقع ويسترن لـ α- سينوكلين تام الطول (طافرات نقطة النمط البري أو الفردية في الوحدات البنائية ١١٨-١٢٦، كما تمت الإشارة) المبقعة باستخدام الجسم المضاد 5D12(لوحة يسرى) أو جسم مضاد للمقارنة 1H7(لوحة يمنى). يوضح الجزء السفلي للشكل القمة اللاصقة لـα -سينوكلين المرتبط بواسطة الجسم المضاد 5D12.

شكل ٩ يصور نموذج كرة وعصا لأحماض أمينية لـα-سينوكلين قريب من مواضع ارتباط الأجسام المضادة 9E4،5C1 و5D12.

الوصف التفصيلي:

١- بصورة عامة

يوفر الاختراع جسم مضاد أحادي النسيلة 5C1 و الأجسام المضادة ذات الصلة، مثل الأجسام المضادة التي ترتبط بنفس القمة اللاصقة على α-سينوكلين (على سبيل المثال، قمة لاصقة ١١٨-١٢٦ لـ α-سينوكلين). تكون الأجسام المضادة للاختراع نافعة، على سبيل المثال، لعلاج الاضطرابات المرتبطة بتراكم α-سينوكلين، على وجه التحديد التراكم في أجسام ليوي .تتضمن الاضطرابات المذكورة أمراض جسم ليوي، مثل مرض باركنسون، مرض جسم ليوي المنتشر (DLBD)، صورة متغيرة لجسم ليوي لمرض الزهايمر (LBV)، مرض الزهايمر وباركنسوم المدمج، القصور الذاتي المفرد وضمور الجهاز المتعدد (MSA). تكون الأجسام المضادة نافعاً أيضاً في تشخيص أمراض جسم ليوي.

٢- جزيئات مستهدفة

يكون α-سينوكلين من النمط البري البشري الطبيعي عبارة عن ببتيد من ١٤٠ الأحماض الأمينية التي يكون لها متوالية الحمض الأميني المذكورة:

MDVFMKGLSKAKEGVVAAAEKTKQGVAEAAGKTKEGVLYVGSKTKEGVV
HGVATVAEKTKEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFVKKD
QLGKNEEGAPQEGILEDMPVDPDNEAYEMPSEEGYQDYEPEA(متوالية رقم
:١)

(Uéda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-6, 1993؛ رقم الوصول في بنك الجينات GenBank: P37840). يتضمن البروتين ثلاث نطاقات مميزة، نطاق تكرار KTKE لتغطية الأحماض الأمينية ١-٦١، نطاق مكون غير نشواني NAC (مكون غير نشواني non-amyloid component) يمتد من الأحماض الأمينية ٦٠-٩٥ تقريباً، و نطاق حمضي طرفي C-terminal acidic domain ممتد من حمض أميني ٩٨ إلى ١٤٠ تقريباً. أوضح Jensen et al. (1995) أن مكون غير نشواني NAC يكون له متوالية الحمض الأميني :

EQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGSIAAATGFV(متوالية رقم :٢)

(Jensen et al., Biochem. J. 310.1: 91-94؛ رقم الوصول في بنك الجينات S56746 GenBank). مع ذلك، أوضح Uéda et al. (1993) أن مكون غير نشواني NAC تتضمن متوالية الحمض الأميني :

KEQVTNVGGAVVTGVTAVAQKTVEGAGS(متوالية رقم :٣)

(Uéda et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:11282-6).

ما لم يتضح خلاف ذلك بوضوح من السياق، تتضمن الإشارة إلى α-سينوكلين وشظاياها متواليات الحمض الأميني من النمط البري البشري الطبيعي المشار إليها سابقاً، و صور متغيرة أليلية human allelic variants بشرية منها، على وجه التحديد تلك المرتبطة بمرض جسم ليوي (مثل، A30P،E46K و A53T، حيث يشير الحرف الأول إلى حمض أميني في متوالية رقم :١، ويكون الرقم عبارة عن موضع رامز في متوالية رقم :١، ويكون الحرف الثاني عبارة عن الحمض الأميني في الصورة المتغيرة الأليلية). يمكن أن توجد الصور المتغيرة المذكورة بشكل اختياري بصورة فردية أو في أي توليفة. يمكن أيضاً أن توجد الطافرات المستحثة induced mutations E83Q، A90V، A76T، والتي تعزز تكتل ألفا سينوكلين alpha synuclein aggregation، أيضاً بصورة فردية أو في توليفة مع بعضها البعض و/ أو صور متغيرة أليلية بشرية human E46K allelic variants، A30P و A53T.

٣- أمراض جسم ليوي

تتميز أمراض جسم ليوي (LBD) بتنكس الجهاز الدوباميني dopaminergic system، تغيرات الحركة، قصور إدراكي، وتكوين أجسام ليوي (LBs) (McKeith et al., Neurology (1996) 47:1113-24). تكون أجسام ليوي عبارة عن رواسب بروتينات كروية توجد في الخلايا العصبية. يؤدي وجودها في المخ إلى اضطراب المخ الوظيفة الطبيعية للمخ واضطراب فعل المرسلات الكيميائية بما في ذلك أسيتيل كولين ودوبامين. تتضمن أمراض جسم ليوي مرض باركنسون (بما في ذلك مرض باركنسون مجهول السبب)، مرض جسم ليوي المنتشر (DLBD) المعروف أيضاً العتة المصاحب لأجسام ليوي (DLB)، صورة متغيرة لجسم ليوي لمرض الزهايمر (LBV)، مرض الزهايمر وباركنسوم المدمج و ضمور الجهاز المتعدد (MSA؛ مثل، ضمور

زيتوني جسري مخيخي Olivopontocerebellar Atrophy، تنكس مخططي سودائي Striatonigral Degeneration ومتلازمة شاي-دريجر Shy-Drager Syndrome). تتشارك مرض جسم ليوي المنتشر DLBD أعراض كل من مرض الزهايمر ومرض باركنسون. يختلف مرض جسيم ليوي المنتشر DLBD عن مرض باركنسون بصورة أساسية من حيث موضع أجسام ليوي. في مرض جسم ليوي المنتشر DLBD، يتم تشكيل أجسام ليوي بصورة أساسية في القشرة. في مرض باركنسون، تتشكل بصورة أساسية في المادة السوداء. تتضمن أمراض جسم ليوي الأخرى القصور الذاتي المفرد، عسر البلع الناتج عن جسم ليوي، LBDالتصادفي، ومرض جسم ليوي LBD الموروث (مثل، طافرات جين α-سينوكلين، PARK3 وPARK4).

٤- الأجسام المضادة

أ- نوعية ارتباط وخواص وظيفية

5C1 عبارة عن جسم مضاد توضيحي للاختراع، حيث تسمى المناطق المتغيرة الناضحة خفيفة وثقيلة السلسلة لها بمتوالية متوالية رقم :٩ ومتوالية رقم :٢٤، على التوالي. يوفر الاختراع أيضاً الأجسام المضادة التي تتنافس مع5C1 للارتباط بـα -سينوكلين، أو التي ترتبط بنفس القمة اللاصقة أو قمة لاصقة متراكبة كـ5C1 ، والتي يكون لها نفس الخواص الوظيفية، مثل تقليل نواتج التكتل العصبية لـα -سينوكلين، تحسين الوظيفة الإدراكية، و/ أو الحفاظ على الكثافة التشابكية و/ أو الكثافة التغصنية.

يمكن إنتاج أجسام مضادة أخرى لها نوعية الارتباط المذكورة بواسطة تحصين الفئران immunizing mice باستخدام α-سينوكلين أو شظية منه (مثل، شظية تتضمن الوحدات البنائية للحمض الأميني amino acid residues ١١٨-١٢٦، أو جزء منها)، و فحص الأجسام المضادة الناتجة للارتباط بـα -سينوكلين، بشكل اختياري بالتنافس مع 5C1. يكون استخدام شظية مفضلاً لتوليد جسم مضاد له نفس القمة اللاصقة كـ5C1 . يمكن أيضاً فحص الأجسام المضادة لمعرفة تأثيرها في: (١) نماذج قارض متحور وراثياً α-سينوكلين تخضع لاختبارات سلوكية behavioral assays، مثل اختبار متاهة الماء لـ Morris Water Maze (MWM) أو اختبار الأشعة الأفقية horizontal beam test، و/ أو اختبارات مناعية

immunological assays للكشف عن α-سينوكلين، تكتل α-سينوكلين، سينباتوفيسين synaptophysin، MAP2، و/ أو PSD95 في نسيج المخ brain tissue؛ (٢) قارض أو نماذج حيوانية غير بشرية أخرى لمرض يتسم بتراكم α-سينوكلين، باستخدام اختبارات سلوكية مثل اختبار متاهة الماء لـ Morris(MWM) أو اختبار الأشعة الأفقية و/ أو اختبارات مناعية للكشف عن α-سينوكلين، تكتل α-سينوكلين، سينباتوفيسين، MAP2، و/ أو PSD95 في نسيج المخ؛ و/ أو (٣) الإنسان الذي يعاني من حالة مرتبطة بتراكم α-سينوكلين، باستخدام اختبارات سلوكية ملائمة. على نحو بديل، أو بشكل إضافي لأي من الطرق السابقة، يمكن فحص الأجسام المضادة مقابل الصور التي تم تطفيرها لـ α-سينوكلين لتحديد جسم مضاد يظهر نفس سمات الربط أو سمات ربط متشابهة 5C1 لمجموعة من تغيرات التطفير mutational changes. يمكن أن تكون الطافرات mutations عبارة عن استبدال شامل بوحدة بنائية واحدة من الألانين (أو سيرين إذا كان الألانين معروف بالفعل) في وقت ما، أو الفواصل الزمنية المتباعدة على نطاق واسع، من خلال α-سينوكلين أو من خلال قطاع منه حيث يكون من المعروف أن تستقر القمة اللاصقة (مثل، الوحدات البنائية ١١٨-١٢٦).

تميز الأشكال ٦-٨ ومثال ٦ القمة اللاصقة لـ 5C1 مقارنةً باثنين من ارتباط الأجسام المضادة الأخرى داخل الوحدات البنائية ١١٨-١٢٦، أي 9E4 و5D12. يختبر تطفير الألانين تأثير تطفير الأحماض الأمينية الفردية، مرة واحدة، في ١١٨-١٢٦ من ألفا سينوكلين. تؤدي سمة التغيرات ذات الصلة للألفة الارتباط (بعبارة أخرى، المساهمة في الربط) الناتجة عن تطفير الأحماض الأمينية المختلفة داخل الوحدات البنائية ١١٨-١٢٦ إلى تمييز القمة اللاصقة. بالنسبة لـ5C1 ، يكون لتطفير أي من الوحدات البنائية ١٢٠-١٢٢ النسبة الأكبر في تقليل الارتباط . يؤدي تطفير الوحدة البنائية ١٢٣ أو ١٢٤ إلى تقليل الارتباط بدرجة كبيرة، ولكن ليس بنفس الدرجة كما في أي من المواضع ١٢٠-١٢٢. يؤدي تطفير الوحدة البنائية ١١٨، ١١٩، ١٢٥ أو الوحدة البنائية ١٢٦ إلى القليل من الفقد في ألفة الارتباط، وعدم تغييرها بصورة أساسية. لأغراض التسبيط، يمكن بشكل تقريبي تقسم تأثيرات التطفير إلى ثلاث فئات: أساسية التقليل التام لارتباط الوحدات البنائية١٢٠-١٢٢ (الذي لا يمكن تمييزه عن عينة المقارنة السالبة)، بصورة أساسية لا يوجد تقليل في ارتباط الوحدات البنائية ١١٨، ١١٩، ١٢٥ و١٢٦ (الذي لا يمكن تمييزه من عينة

المقارنة الموجبة) و التقليل المتوسط للألفة ربط الوحدات البنائية١٢٣ و١٢٤. بالتالي يمكن تمييز القمة اللاصقة لـ5C1 كقمة لاصقة خطية تتكون من أو تتكون بصورة أساسية من الوحدات البنائية ١٢٠-١٢٤ لمتوالية رقم :١، باستخدام الوحدات البنائية ١٢٠-١٢٢ لعمل اسهامات كبيرة في الربط. يتم توفير القمة اللاصقة للأجسام المضادة 5C1 كما تم التمييز بواسطة أي من الوصف الوارد في الفقرة. تتسم بعض من الأجسام المضادة بقمة لاصقة تتكون بصورة أساسية من الوحدات البنائية ١٢٠-١٢٢ و استبعاد الوحدات البنائية ١١٩-١٢٠ مما يعني أن الوحدات البنائية ١٢٠-١٢٢ تساهم كل منها بشكل كبير في الربط مقارنةً بأي وحدة بنائية أخرى ولا توفر الوحدات البنائية ١١٩ و١٢٠ مساهمة في الربط يمكن الكشف عنها (مثل، بواسطة طريقة فحص الألانين للمثال). يمكن أن تكون الوحدات البنائية ١٢٣ و١٢٤ أو لا تساهم بدرجة قليل في الربط في الأجسام المضادة المذكورة.

بالنسبة لـ5D12 ، تتسم القمة اللاصقة بتطفير الألانين كما يلي. يكون لتطفير أي من الوحدات البنائية ١٢٠-١٢٢ النسبة الأكبر في تقليل الارتباط. يؤدي تطفير الوحدة البنائية ١١٨، ١٩٩، ١٢٣ أو ١٢٤ إلى انخفاض الارتباط بدرجة كبيرة، ولكن ليس بنفس الدرجة كما في أي من المواضع ١٢٠-١٢٢. يؤدي تطفير الوحدة البنائية ١٢٥ أو الوحدة البنائية ١٢٦ إلى تقليل الفقد في ألفة الارتباط binding affinity، وعدم تغييرها بصورة أساسية. للتبسيط، يمكن تقسم تأثيرات التطفير فرعياً إلى ثلاث فئات: التقليل التام بصورة أساسية لارتباط طافرات الوحدات البنائية ١٢٠-١٢٢ (الذي لا يمكن تمييزه عن عينة المقارنة السالبة)، عدم تقليل الارتباط بصورة أساسية للوحدات البنائية ١٢٥ و١٢٦ (الذي لا يمكن تمييزه من عينة المقارنة الموجبة) والتقليل المتوسط للألفة ربط الوحدات البنائية ١١٨، ١١٩، ١٢٣ و١٢٤. بالتالي يمكن تمييز القمة اللاصقة لـ 5D12 كقمة لاصقة خطية تتكون من أو تتكون بصورة أساسية من للوحدات البنائية ١١٨-١٢٤ لمتوالية رقم :١، حيث تقدم الوحدات البنائية١٢٠-١٢٢ المساهمة الأكبر في الربط. يكون للأجسام المضادة الأخرى قمة لاصقة لـ5D12 كما تم التمييز بواسطة أي من حالات الوصف الورادة في الفقرة المذكورة أو مثال ٦.

على غرار ذلك، يمكن تمييز القمة اللاصقة 9E4 بواسطة طافرات الوحدة البنائية ١٢٢ و١٢٥ والتي توضح كل منها انخفاض كبير في الارتباط بدلاً من أي من الوحدات البنائية ١١٨-١٢١،

١٢٣، ١٢٤ أو ١٢٦. لتبسيط تأثيرات التطفير فيمكن تقسيمها إلى فئتين: التقليل التام بصورة أساسية لارتباط الوحدات البنائية١٢٢ و١٢٥ ولا تؤدي إلى تقليل الارتباط بالوحدات البنائية ١١٨-١٢١، ١٢٣، ١٢٤ و١٢٦. بالتالي تتسم القمة اللاصقة 9E4 بأنها قمة لاصقة توافقية حيث توفر الوحدات البنائية ١٢٢ و١٢٥ نقاط التلامس (أو المساهمة الأكبر في الربط) باستخدام 9E4. تم توفير أجسام مضادة أخرى بها 9E4 قمة لاصقة كما تم التمييز بواسطة أي من حالات الوصف الواردة في الفقرة المذكورة أو مثال ٦. بشكل اختياري، لا يكون الجسم المضاد عبارة عن 9E4 أو جسم مضاد آخر له مثل 9E4 ولا يتضمن جسم مضاد٥ CDRs) Kabat) على الأقل بنسبة تطابق تبلغ ٨٥٪ على الأقل من المتوالية لـCDRs)) المناظرة لـ 9E4.

يمكن أيضاً إنتاج أجسام المضادة لها نوعية ارتباط لجسم مضاد فأري تم اختياره (مثل،5C1) باستخدام صورة متغيرة لطرقة إظهار الملتهمة. انظر Winter، الطلب الدولي رقم ٢٠٧٩١/٩٢. تكون هذه الطريقة مناسبة على وجه التحديد لإنتاج أجسام مضادة بشرية. في هذه الطريقة، يتم استخدام المنطقة المتغيرة ثقيلة أو خفيفة السلسلة لجسم مضاد فأري تم اختياره كمادة بادئة. على سبيل المثال، إذا تم اختيار المنطقة المتغيرة خفيفة السلسلة كمادة بادئة، يتم إنشاء مجموعة ملتهمة حيث تظهر الأعضاء نفس المطقة المتغيرة خفيفة وثقيلة السلسلة (أي، المادة البادئة الفأرية murine starting material) والمنطقة المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة المختلفة. يمكن الحصول على المنطقة المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة على سبيل المثال من مجموعة من المناطق المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة البشرية التي تم إعادة وضعها. تم اختيار ملتهمة تظهر ارتباط نوعي قوي لـ α-سينوكلين (مثل، على الأقل ١٠ ٨ مولار-١، و بشكل مفضل ١٠ ٩ مولار -١ على الأقل). تعمل المنطقة المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة من هذه الملتهمة كمادة بادئة لإنشاء مجموعة ملتهمة أخرى. في هذه المجموعة، تظهر كل ملتهمة نفس المنطقة المتغيرة ثقيلة السلسلة (أي، المنطقة المحددة من مجموعة العرض الأولى) والمنطقة المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة المختلفة. يمكن الحصول على المنطقة المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة على سبيل المثال من مجموعة من المناطق ذات السلسلة الخفيفة المتغيرة البشرية التي تم إعادة وضعها. مرة أخرى، يتم اختيار ملتهمة تظهر ارتباط نوعي قوي لـα -سينوكلين. عادةً يكون للأجسام المضادة التي يكون لها نفس القمة اللاصقة أو قمة لاصقة متشابهة نوعية مثل المادة البادئة الفأرية.

يمكن الحصول على أجسام مضادة أخرى بواسطة تطفير المُشفر لجسم مضاد تموذجي للسلاسل الثقيلة والخفيفة، مثل 5C1. بالتالي، يتم أيضاً تضمين الأجسام المضادة أحادية النسيلة والتي تكون متطابقة بنسبة ٧٠٪، ٨٠٪، ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪ أو ٩٩٪ على الأقل مع 5C1 في متوالية الحمض الأميني للمناطق المتغيرة ثقيلة و/ أو خفيفة السلسلة الناضجة وتحافظ على الخواص الوظيفية لها، و/ أو التي تختلف عن الجسم المضاد المناظر بعدد صغير من استبدالات الحمض الأمينية غير المنطقية الوظيفية (مثل، الاستبدالات المحافظة conservative substitutions)، عمليات حذف، أو عمليات إدخال في الاختراع.

يتضمن الاختراع أيضاً الأجسام المضادة أحادية النسيلة التي تتضمن بعض أو جميع (مثل، ٣، ٤، ٥، و بشكل مفضل ٦) التي يتم الحصول عليها كلياً أو بدرجة كبيرة من 5C1. يمكن أن تتضمن الأجسام المضادة المذكورة منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة والتي تتضمن على الأقل اثنين، وعادة ثلاث التي يتم الحصول عليها كلياً أو بدرجة كبيرة من المنطقة المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة لـ5C1 و/ أو المنطقة المتغيرة خفيفة السلسلة التي تتضمن اثنين على الأقل، وعادة جميع الثلاث من التي يتم الحصول عليها كلياً أو بدرجة كبيرة من المنطقة المتغيرة خفيفة السلسلة لـ5C1 . تتضمن الأجسام المضادة المفضلة كلا السلاسل الثقيلة والخفيفة. يتم الحصول على بصورة أساسية من 5C1 مناظر حيث تتضمن ما لا يزيد عن ٤، ٣، ٢ أو ١ من عمليات الاستبدال، عمليات الإدخال أو عمليات الحذف، ما عدا أن (عند التعريف بواسطة Kabat) يتضمن ما لا يزيد عن ٦، ٥، ٤، ٣، ٢، أو ١ استبدال، عمليات الإدخال أو عمليات الحذف. يمكن أن يكون للأجسام المضادة المذكورة بشكل مفضل على الأقل ٧٠٪، ٨٠٪، ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪ أو ٩٩٪ من التطابق مع 5C1 في متوالية الحمض الأميني للمناطق المتغيرة ثقيلة و/ أو خفيفة السلسلة الناضجة و الحفاظ على الخواص الوظيفية لها، و/ أو تختلف عن 5C1 بعدد صغير من استبدالات الحمض الأميني غير المنطقية الوظيفية(مثل، الاستبدالات المحافظة)، عمليات الحذف، أو عمليات الإدخال.

تظهر الأجسام المضادة المفضلة نفس الفاعلية الوظيفية لـ5C1 ، مثل، تقليل نواتج التكتل المتعلقة بالتهاب الأعصاب neuritic و/ أو نواتج التكتل العصبية α-سينوكلين axonal -synuclein aggregates، تقليل الضمور المتعلق بالتهاب الأعصاب neuritic dystrophy، تحسين

الوظيفة الإدراكية cognitive function، عكس، معالجة أو تثبيط التدهور المعرفي inhibiting cognitive decline، و/ أو الحفاظ على أو زيادة الكثافة التشابكية synaptic density و/ أوالكثافة التغصنية dentritic density.

ب- أجسام مضادة خيمرية veneered antibodies ومكسوة chimeric

٥ يوفر الاختراع أيضاً صورة خيميرية ومكسوة لأجسام مضادة غير بشرية non-human antibodies، على وجه التحديد 5C1.

يكون الجسم المضاد الخيمري عبارة عن جسم مضاد حيث يتم دمج المناطق المتغيرة الناضجة للسلاسل الخفيفة والثقيلة للجسم المضاد غير البشري(مثل، فأر) مع المناطق الثابتة ذات السلسلة الخفيفة والثقيلة البشرية. بصورة نمطية، تكون المناطق الثابتة ذات السلسلة الخفيفة والثقيلة من ١٠ أصل بشري، ولكن يمكن أن تنشأ المناطق الثابتة من أنواع غير بشرية مختلفة كما هو مطلوب (مثل، لتسهيل اختبار الجسم المضاد غير البشري في نموذج حيواني ملائم). يمكن أن تحتفظ الأجسام المضادة المذكورة بدرجة كبيرة أو كلياً بنوعية ارتباط لجسم مضاد فأري، ويمكن أن تبلغ حوالي ٢/ ٣ من المتوالية البشرية المشترك فيها بواسطة مناطق ثابتة بشرية human constant regions.

١٥ يكون الجسم المضاد المكسو عبارة عن نوع من جسم مضاد متوافق مع البشر والذي يحتفظ ببعض و عادة جميع (CDRs) و بعض من الوحدات البنائية الإطارية للمنطقة المتغيرة غير البشرية للجسم المضاد غير البشري ولكن تستبدل الوحدات البنائية الإطارية المتغيرة variable region framework residues الأخرى التي تساهم في القمم اللاصقة للخلية B و T، على سبيل المثال الوحدات البنائية المكشوفة (Padlan, Mol. Immunol. 28:489, 1991) مع الوحدات البنائية ٢٠ التي تم الحصول عليها من المواضع المناظرة لمتوالية الجسم المضاد البشري human antibody sequence. تتمثل النتيجة في جسم مضاد يتم فيه الحصول على (CDRs) كلياً أو بدرجة كبيرة من جسم مضاد غير بشري وتكون فيها إطارات المنطقة المتغيرة للجسم المضاد غير البشري أكثر بشرية بواسطة الاستبدالات.

ج- أجسام مضادة متوافقة مع البشر

ترتبط الأجسام المضادة 5C1 المتوافقة مع البشر على وجه التحديد بـ α-سينوكلين بشري. يمكن أن تكون ألفة بعض الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر (أي، Ka)، على سبيل المثال، في نطاق عامل يبلغ ٥ أو ٢ من عامل الجسم المضاد 5C1 الفأري. يكون لبعض من الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر ألفة متشابهة، في خطأ التجريب، مثل 5C1 فأري. يكون لبعض الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر ألفة أكبر من 5C1 الفأري. ترتبط الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر المفضلة بنفس القمة اللاصقة و/ أو تتنافس مع5C1 فأري للارتباط بـα -سينوكلين البشري.

يكون الجسم المضاد المتوافق مع البشر عبارة عن جسم مضاد محور ورثياً حيث يتم تطعيم (CDRs) تم الحصول عليه من جسم مضاد"مانح" غير بشري مثل،5C1 فأري) داخل جسم مضاد لمتوالية "مستقبل" بشري (انظر، مثل،Queen ، البراءة الأمريكية رقم ٥،٥٣٠،١٠١ و Winter؛٥،٥٨٥،٠٨٩ ، البراءة الأمريكية رقم Carter،٥،٢٢٥،٥٣٩ ، البراءة الأمريكية رقم Adair،٦،٤٠٧،٢١٣ ، البراءة الأمريكية رقم ٥،٨٥٩،٢٠٥ Foote،٦،٨٨١،٥٥٧ ، البراءة الأمريكية رقم ٦،٨٨١،٥٥٧). يمكن أن تكون متواليات الجسم المضاد للمستقبل، على سبيل المثال، عبارة عن متوالية جسم مضاد بشري ناضج، تركيبة من تلك المتواليات، متوالية متفق عليها لمتواليات جسم مضاد بشري، أو متوالية منطقة سلالة جرثومية germline region sequence. بالتالي، يكون الجسم المضاد 5C1 المتوافق مع البشر عبارة عن جسم مضاد يتضمن بعض أو جميع التي يتم الحصول عليها كلياً أو بدرجة كبيرة من 5C1 فأري والمنطقة المتغيرة لمتواليات إطارية ومناطق ثابتة، إن وجدت، التي يتم الحصول عليها كلياً أو بدرجة كبيرة من متواليات جسم مضاد بشرية. على غرار السلسلة الثقيلة المتوافقة مع البشر التي تتضمن انين على الأقل وعادةً جميع ثلاث التي يتم الحصول عليها كلياً أو بدرجة كبيرة من aمانح جسم مضاد ثقيل السلسلة، ومتوالية إطارية لمنطقة متغيرة ثقيلة السلسلة ومنطقة ثابتة ثقيلة السلسلة، إن وجدت، تم الحصول عليها بدرة كبيرة من إطار منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة بشرية ومتواليات المنتطقة الثابتة. على غرار ذلك تتشمن السلسلة الخفيفة المتوافقة مع البشر اثنين على الأقل و وغالباً جميع الثلاث من التي يتم الحصول عليها كلياً أو بدرجة كبيرة من مانح جسم مضاد خفيف السلسلة، ومتوالية المنطقة المتغيرة خفيفة السلسلة و ومنطقة ثابتة خفيفة السلسلة، إن وجدت، التي تم الحصول عليها بصورة

أساسية من إطار المنتقطة المتغيرة خفيفة السلسلة البشرية ومتواليات المنتطقة الثابتة. خلاف الأجسام متناهية الصغر وdAbs، يشتمل الجسم المضاد المتوافق مع البشر على السلسلة الثقيلة المتوافقة مع البشر و سلسلة خفيفة متوافقة مع البشر. بشكل مفضل يكون ٨٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪ أو ١٠٠٪ على الأقل من الوحدات البنائية المناظرة (كما تم التحديد بواسطة Kabat) متماثل بين (CDRs)المناظرة. يتم الحصول على المنطقة المتغيرة لمتواليات إطارية للجسم المضاد سلسلة الجسم المضاد للمنطقة الثابتة بصورة أساسية من متوالية إطارية للمنطقة المتغيرة البشرية أو المنطقة الثابتة البشرية، على التوالي، عندما تكون ٨٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪، ٩٩٪، أو ١٠٠٪ على الأقل من الوحدات البنائية المناظرة المحددة بواسطة Kabat متماثلة.

رقم أن الأجسام المضادة المتوافقة مع البشر تتضمن عادةً جميع ٦ (بشكل مفضل كما تم التحديد بواسطة Kabat) تم الحصول عليها من جسم مضاد فأري، فيمكن أيضاً أن تتكون من القليل من جميع (٣، ٤، أو ٥ على الأقل) (CDRs) من جسم مضاد فأري(مثل:

Pascalis et al., J. Immunol. 169:3076, 2002; Vajdos et al., Journal of Molecular Biology, 320: 415-428, 2002; Iwahashi et al., Mol. Immunol. 36:1079-1091, 1999; Tamura et al, Journal of Immunology, 164:1432-1441, 2000).

في بعض الأجسام المضادة يكون جزء فقط من أي مجموعة فرعية من الوحدات البنائية المطلوبة للارتباط، التي تسمى النوعية التي تحدد الوحدات البنائية(SDRs):

(Kashmiri et al., Methods (2005) 36(1):25-34)، مطلوبة للحفاظ على الارتباط في جسم مضاد متوافق مع البشر. لا تتلامس الوحدات البنائية مع مولد الضد وليس في ويمكن تحديدها على أساس الدراسات السابقة (على سبيل المثال تكون واحد أو أكثر من أو جميع الوحدات البنائية H60-H65 في تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) H2 في بعض الأحيان غير مطلوبة)، من مناطق (CDRs Kabat) التي تقع خارج حلقات مفرطة التغير Chothia (Chothia, J. Mol. Biol. 196:901, 1987)، بواسطة القولبة الجزيئية و/ أو تجريبياً، أو كما تم الوصف في Gonzales et al., Mol. Immunol. 41: 863, 2004. في الأجسام

المضادة المتوافقة مع البشر، عند المواضع التي يغيب فيها واحد أو أكثر من مانح الوحدات البنائية أو التي يتم فيها حذف المانح الكلي، يمكن أن يكون الحمض الأميني الذي يشغل الموضع عبارة عن حمض أميني يشغل الموضع المناظر (بواسطة ترقيم Kabat) في متوالية مستقبل الجسم المضاد. يعكس رقم استبدالات المستقبل المانح للأحماض الأمينية في المشتمل عليها التوزان لأغراض التنافس. من المحتمل أن تكون تلك الاستبدالات نافعة في تقليل رقم الأحماض الأمينية الفأرية في جسم مضاد متوافق مع البشر و بالتالي تقليل تولد المناعة المحتمل. مع ذلك، يمكن أيضاً أن تؤدي الاستبدالات إلى تغيير الألفة، ويتم تجنب الانخفاضات الكبيرة في الألفة بشكل مفضل. يمكن اختيار مواضع الاستبدال داخل (CDRs) و الأحماض الأمينية للاستبدال بصورة تجريبية.

بشكل اختياري يتم اختيار متواليات الجسم المضاد لمستقبل بشري من بين العديد من متواليات الجسم المضاد البشري المعروف لتوفير درجة مرتفعة من تطابق المتوالية (مثل، ٦٥٪-٨٥٪ نسبة تطابق) بين أطر المنطقة المتغيرة لمتوالية مستقبل بشري وأطر المنطقة المتغيرة المناظرة لسلسلة جسم مضاد مانح.

يمكن اختيار أحماض أمينية محددة من الوحدات البنائية لأطر المنطقة المتغيرة البشرية للاستبدال على أساس التأثير المحتمل لها على توافق و/ أو الارتباط بمولد الضد. يتم فحص التأثيرات المحتملة بواسطة القولبة، فحص خواص الأحماض الأمينية عند مواضع محددة، أو الملاحظة التجريبية لتأثيرات استبدال أو تطفير أحماض أمينية محددة.

على سبيل المثال، عندما يختلف حمض أميني بين الوحدة البنائية لإطار منطقة متغيرة فأري و ووحدة بنائية لإطار منطقة متغيرة بشري تم اختيارها، فيمكن استبدال الحمض الأميني لإطار بشري بواسطة حمض أميني إطاري مكافئ من جسم مضاد فأري عندما يكون من المقبول أن يقوم الحمض الأميني بـ:

(١) الارتباط غير التساهمي لمولد الضد مباشرةً noncovalently binds antigen،

(٢) عندما يكون مجاوراً لمنطقة،

(٣) عندما يتافعل مع منطقة (أي يكون في نطاق يتراوح من حوالي ٦ أنجستروم للمنطقة تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR))، (مثل، كما تم التحديد بواسط قولبة السلسلة الخفيفة أو الثقيلة على البنية المتحللة لسلسلة جلوبيولين مناعي معروفة متماثلة)؛ و

(٤) الوحدة البنائية المشاركة في السطح البيني VL–VH.

على نحو بديل يمكن الإشارة إلى الوحدات البنائية الإطارية من الفئات (١)–(٣) كما تم التحديد بواسطة Queen، البراءة الأمريكية رقم ٥/٥٣٠,١٠١ بتعبير الوحدات الإطارية المعيارية والدقيقة. يتم الإشارة إلى الوحدات البنائية الإطارية التي تساعد في تحديد توافق حلقة تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) في بعض الأحيان بتعبير الوحدات البنائية المعيارية :

(Chothia and Lesk, J. Mol. Biol. 196, 901–917 (1987), Thornton & Martin J. Mol. Biol., 263, 800–815, 1996).

ويتم الإشارة إلى الوحدات البنائية الإطارية التي تدعم توافقات حلقة ربط –مولد الضد وتلعب دوراً في الموالفة الدقيقة لتوافق الجسم المضاد مع مولد الضد في بعض الأحيان بتعبير الوحدات البنائية الدقيقة:

(Foote & Winter, 1992, J Mol Bio. 224, 487–499).

تكون الوحدات البنائية الإطارية الأخرى التي تكون عبارة عن مرشحات substitution للاستبدال عبارة عن الوحدات البنائية التي توجد مواضع معالجة بالجليكوسيل glycosylation site محتملة. وتكون مرشحات الاستبدال الأخرى أيضاً عبارة عن أحماض امينية لمستقبل إطاري بشري غير المعروفة للجلوبيوليينات المناعية البشرية human immunoglobulin عند الموضع المذكور. يمكن استبدال الأحماض الأمينية المذكورة بالأحماض الأمينية التي تم الحصول عليها من الموضع المكافئ لجسم مضاد مانح فأري أو من المواضع المكافئة للجلوبيوليينات المناعية البشرية النمطية.

يوفر الاختراع صور متوافقة مع البشر لجسم مضاد 5C1 فأري. يشتمل الجسم المضاد الفأري على مناطق متغيرة ذات سلسلة خفيفة وثقيلة بها حمض أميني المتواليات تشتمل على متوالية رقم : ٩ ومتوالية رقم: ٢٤، على التوالي. يوفر الاختراع ٥ مناطق متغيرة ذات سلسلة ثقيلة ناضحة

متوافقة مع البشر تجسيدية: H1، متوالية رقم: ١٤؛ H2، متوالية رقم: ١٥؛ H3، متوالية رقم: ١٦؛ H4، متوالية رقم: ١٧؛ و H5، متوالية رقم: ١٨. يوفر الاختراع أيضاً ٤ مناطق متغيرة ذات سلسلة خفيفة ناضجة متوافقة مع البشر توضيحية: L1، متوالية رقم: ٢٩؛ L2، متوالية رقم: ٣٠؛ L3، متوالية رقم: ٣١؛ و L4، متوالية رقم: ٣٢. تتضمن الأجسام المضادة أي من الطافرات المسبقة للمناطق المتغيرة المذكورة ذات سلسلة خفيفة وثقيلة، أي، H1L2، H1L3، H1L4، H2L1، H2L2، H2L3، H2L4، H3L1، H3L2، H3L3، H3L4، H4L1، H4L2، H4L3، H4L4، H5L1، H5L2، H5L3، أو H5L4. يكون للصورة المتغيرة H4L3، التي تتضمن ٨ طافرات عكسية ثقيلة السلسلة heavy chain backmutations و ٥ طافرات عكسية خفيفة السلسلة، ألفة لـ α-سينوكلين (كما تم القياس على وسيلة Biacore) والتي تكون في عامل من اثنين معدلات الألفة للجسم المضاد 5C1 الخيمري والفأري. انظر جدول ٣، التالي. كما تم القياس بواسطة اختبار فحص الأنزيم المرتبط مناعياً ELISA، ويكون للصورة المتغيرة H4L3 الألفة لـ α-سينوكلين والذي يكون متشابهاً مع الجسم المضاد 5C1 الخيمري (في خطأ التجريب) وبصورة فائقة على الجسم المضاد 5C1 الفأري. انظر شكل ٥. بالإضافة إلى ذلك، الصورة المتغيرة H5L3، التي تتضمن ٦ طافرات عكسية ثقيلة السلسلة و ٥ طافرات عكسية خفيفة السلسلة، والتي توفر الألفة مع α-سينوكلين بشري (كما تم القياس على وسيلة Biacore) والتي تكون في عامل مكون من ٤ معدلات ألفة للجسم المضاد الخيمري والفأري 5C1. انظر جدول ٣، التالي. توفر الصورة المتغيرة H3L4، التي تتضمن ٩ طافرات عكسية ثقيلة السلسلة و اثنين من الطافرات العكسية خفيفة السلسلة، أيضاً الألفة لـ α-سينوكلين بشري (كما تم القياس بواسطة اختبار فحص الأنزيم المرتبط مناعياً ELISA) والذي يكون مشابها بدرجة كبيرة مع الجسم المضاد الخيمري 5C1، في خطأ التجريب، و H3L3 والصور المتغيرة H3L1، حيث تتضمن كل منها ٩ طافرات عكسية ثقيلة السلسلة و ٥ و ٦ طافرات عكسية خفيفة السلسلة light chain backmutations، على التوالي، معدلات ألفة لـ α-سينوكلين والتي تكون فائقة على الجسم المضاد الفأري 5C1 (كما تم القياس بواسطة اختبار فحص الأنزيم المرتبط مناعياً ELISA).

يوفر الاختراع صور متغيرة من الجسم المضاد 5C1 المتوافق مع البشر H4L3 حيث تظهر المنطقة المتغيرة ذات السلسلة القثيلة الناضجة المتوافقة مع البشر ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪،

٩٨٪، أو ٩٩٪ على الأقل من التطابق مع H4 (متوالية رقم: ١٧) وتظهر المنطقة المتغيرة خفيفة السلسلة الناضجة المتوافقة مع البشر ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪، أو ٩٩٪ على الأقل من تطابق المتوالية مع L3(متوالية رقم: ٣١). في بعض الأجسام المضادة المذكورة، يتم احتجاز واحد على الأقل، اثنين، ثلاث، أربع، خمس، ست،سبع، ثمانية، تسع، عشرة، إحدى عشر، اثني عشر، أو جميع ١٣ الطافرات العكسية في H4L3. يوفر الاختراع أيضاً صور متغيرة من الجسم المضاد 5C1 المتوافق مع البشر H5L3 حيث توضح المنطقة المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة الناضجة المتوافقة مع البشر ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪، أو ٩٩٪على الأقل من التطابق مع H5 (متوالية رقم: ١٨) وتظهر المنطقة المتغيرة خفيفة السلسلة الناضجة المتوافقة مع البشر ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪، أو ٩٩٪ على الأقل من التطابق مع المتوالية L3 (متوالية رقم: ٣١). في بعض الأجسام المضادة المذكورة، يمكن احتجاز واحد على الأقل، اثنين، ثلاث، أربع، خمس، ست،سبع، ثمانية، تسع، عشرة، أو جميع ١١ الطافرات العكسية في H5L3. يوفر الاختراع أيضاً صور متغيرة من الجسم المضاد 5C1 المتوافق مع البشر H3L4 حيث تظهر المنطقة المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة الناضجة المتوافقة مع البشر يوضح ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪، أو ٩٩٪ على الأقل من التطابق مع H3(متوالية رقم: ١٦) وتظهر المنطقة المتغيرة خفيفة السلسلة الناضجة المتوافقة مع البشر ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪، أو ٩٩٪ على الأقل من تطابق المتوالية مع L4 (متوالية رقم: ٣٢). في بعض الأجسام المضادة المذكورة، يتم احتجاز واحد على الأقل، اثنين، ثلاث، أربع، خمس، ست،سبع، ثمانية، تسع، عشرة، أو ١١ من جميع الطافرات العكسيةفي H3L4. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل واحد على الأقل من المواضع H11، H27، H30، H48، وH73 في المنطقة Vh بواسطة L،Y، T، I ، وK، على التوالي. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل المواضع H11، H27، H30، H48، وH73 في المنطقة Vh بواسطة L،Y، T، I ، وK، على التوالي. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل واحد على الأقل من المواضع H67، H69، H91، وH94 في المنطقة Vh بواسطة A، L، F، وS، على التوالي. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل المواضع H67، H69، وH94 في المنطقة Vh بواسطة A، L، وS، على التوالي، مثل في نسخة H4. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل موضع H94 بواسطة S، مثل في نسخةH5 . في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل المواضع H67، H69، H91، وH94 في المنطقة Vh بواسطة A،L، F ، وS، على التوالي، مثل في

نسخة H3. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل واحد على الأقل من المواضع L12 وL14 في المنطقة Vk بواسطة S. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل كلا المواضع L12 وL14 في المنطقة Vk بواسطة S، مثل في النسخ L3 وL4. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل واحد على الأقل من المواضع L2، L45،L49 ، وL87 في المنطقة Vk بواسطة K،V ،N ، وF، على التوالي. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل المواضع L2،L49 ، وL87 في المنطقة Vk بواسطة V، N، وF، على التوالي، مثل في نسخة L3. في بعض الأجسام المضادة، يتم شغل المواضع L2، L45،L49 ، وL87 في المنطقة Vk بواسطة K،V ،N ، وF، على التوالي، مثل في نسخة L1. يمكن أن تكون المناطق للأجسام المضادة المتوافقة مع البشر المذكورة متماثلة أو متماثلة إلى حد كبير مع المناطق تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) لـH4L3 أو H5L3، والتي تكون مشابهة لتلك الخاصة بالجسم المضاد مانح فأري. يمكن تحديد المناطق تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) بواسطة أي تعريف تقليدي (مثل، Chothia) ولكن تكون بشكل مفضل كما تم التحديد بواسطة Kabat.

تتمثل أحد احتمالات التغير الإضافي في الصور المتغيرة 5C1 المتوافق مع البشر في الطافرات العكسية الإضافية في أطر المنطقة المتغيرة. يمكن أن تستوعب العديد من الوحدات البنائية الإطارية غير المتلامسة في mAb المتوافق مع البشر استبدالاتof الأحماض الأمينية التي تم الحصول عليها من المواضع المناظرة لمانح mAb فأري أو الأجسام المضادة الفأرية أو البشرية الأخرى، ويمكن أن تكون العديد من وحدات التلامس البنائية المحتملة عرضة للاستبدال أو يمكن تغيير الأحماض الأمينية داخل على سبيل المثال، باستخدام الوحدات البنائية الموجودة عند الموضع المناظرلمتوالية المستقبل البشري المستخدمة لتوفير أطر المنطقة المتغيرة. بالإضافة إلى ذلك، يمكن استخدام م مستقبل متواليات بشري بديل، على سبيل المثال، لسلسلة الثقيلة و/ أو الخفيفة. إذا تم استخدام مستقبل متواليات مختلف، فيمكن عدم إجراء واحدة أو أكثر من الطافرات العكسية المقترحة سابقاً حيث أن الوحدات البنائية المانحة والمستقبلة المناظرة تكون متشابهة بالفعل بدون طافرات عكسية. على سبيل المثال، عند استخدام متوالية مستقبل ذات سلسلة ثقيلة حيث يتم فيها شغل موضعH11 بالفعل بواسطة L، H48 يكون مشغول بالفعل بواسطة I، و/ أو H73 يكون مشغول بالفعل بواسطة K، ولا تكون الطافرة (الطافرات) العكسية المناظرة ضرورية. على

غرار ذلك، عند استخدام متوالية مستقبل خفيفة السلسلة حيث يتم شغل موضع L12 و/ أو L14 بواسطة S، فتكون الطافرة (الطافرات) العكسية المناظرة corresponding backmutation(s) غير ضرورية.

يتضمن الاختراع أيضاً أجسام مضادة متوافقة مع البشر حيث توضح المناطق المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة والثقيلة المناظرة ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪، أو ٩٩٪ على الأقل من تطابق المتوالية مع المناطق المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة والثقيلة المناظرة لـ5C1 H1L1، H1L2، H1L3، H1L4، H2L1،H2L2، H2L3، H2L4 ، H3L1، H3L2، H3L3، H4L1، H4L2، H4L4، H5L1، H5L2، أو H5L4 على الأقل. يمكن أن تكون المناطق للأجسام المضادة المتوافقة مع البشر المذكورة متماثلة أو متماثلة إلى حد كبير مع تلك الخاصة بالجسم مضاد مانح فأري mouse donor antibody. يمكن تحديد المناطق بواسطة أي تعريف تقليدي (مثل، Chothia) ولكن تكون بشكل مفضل كما تم التحديد بواسطة Kabat.

د-اختيار منطقة ثابتة

يمكن ربط المناطق المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة والثقيلة للجسم المضاد الخيمري، المتوافق مع البشر (التي تتضمن الأجسام المكسوة)، أو الأجسام المضادة البشرية بجزء على الأقل من المنطقة الثابتة الكافية للتفاعل مع مستقبل Fc. بصورة نمطية تكون المنطقة الثابتة عبارة عن منطقة ثابتة بشرية، ولكن يمكن اختيار المنطقة الثابتة غير البشرية كما هو مطلوب.

يعتمد اختيار المنطقة الثابتة، بشكل جزئي، على ما إذا كان الجسم المضاد المكمل غير المستقل و/ أو السمية الخلوية المساهم فيها خلوياً مطلوبة. على سبيل المثال، يكون النظائر البشرية IgG1 و IgG3 سمية خلوية مساهم فيها متممة بينما يكون للأنماط المتماثلة البشرية IgG2 و IgG4 سمية خلوية مساهم فيها متممة ضعيفة أو منعدمة. يكون للمنطقة الثابتة البشرية IgG1 المناسبة للتضمين في الأجسام المضادة للاختراع تسلسل متوالية رقم: ٣٨. يمكن أن تكون المناطق الثابتة خفيفة السلسلة عبارة عن لمدا أو كابا. يمكن أن يكون للمنطقة الثابتة خفيفة السسلة كابا البشرية المناسبة للتضمين في الأجسام المضادة للاختراع تسلسل المتوالية رقم: ٤٠. يمكن التعبير عن الأجسام المضادة في صورة وحدات ذات تشكيل رباعي تتضمن اثنين السلاسل الخفيفة واثنين من

السلاسل الثقيلة، مثل سلاسل ثقيلة منفصلة، سلاسل خفيفة منفصلة، مثل Fab،Fab' ، F(ab')2، أو شظايا Fv، أو كأجسام مضادة ذات سلسلة مفردة حيث تكون المناطق المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة والخفيفة مرتبطة من خلال مباعد.

تظهر المناطق الثابتة البشرية تغير متغاير النمط وتغير متماثل النمط بين أفراد مختلفين. بعبارة أخرى، يمكن أن تختلف المناطق ثابتة في أفراد مختلفين عند واحد أو أكثر من المواضع متعددة الصور. تختلف الأنماط المتماثلة عن الأنماط المتغيرة حيث أن الأمصال التي تمييز النمط المتماثل ترتبط بمنطقة غير متعددة الشكل لواحدة أو أكثر من الأنماط المتماثلة الأخرى. تتضمن الإشارة إلى منطقة ثابتة بشرية المنطقة الثابتة التي يكون لها نمط متغاير طبيعي أو أي طافرة مسبقة للوحدات البنائية التي تشغل المواضع متعددة الصور في الأنماط المتغيرة الطبيعية أو ما يصل إلى ٣، ٥ أو ١٠ استبدالات لتقليل أو زيادة وظيفة المؤثر كما تم الوصف فيما يلي.

يمكن أن تكون العديد من الأحماض الأمينية عند النهاية الطرفية كربوكسي لسلسلة الخفيفة و/ أو الثقيلة، مثل ليسين عند النهاية الطرفية C لسلسلة ثقيلة، مفقودة أو مشتقة فب جزء أو جميع الجزيئات. يمكن عمل استبدالات في المناطق الثابتة لتقليل أو زيادة وظيفة المؤثر مثل سمية خلوية مساهم فيها متممة complement-mediated cytotoxicity (انظر، على سبيل المثال، Winter et al.، البراءة الأمريكية رقم ٥٦٢٤٨٢١؛ Tso et al.، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٣٤٥٩٧؛ و:

Lazar et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 103:4005, 2006، أو فترة نصف العمر المطولة في الكائنات البشرية (انظر، مثل:

Hinton et al., J. Biol. Chem. 279:6213, 2004) تتضمن الاستبدالات التوضيحية Exemplary substitutions عند موضع ٢٥٠ و/ أو عند موضع ٤٢٨ (يتم استخدام ترقيم الاتحاد الأوروبي EU في هذه الفقرة للمنطقة الثابتة) لزيادة فترة نصف العمر للجسم المضاد. يمكن أن تؤدي الاستبدالات عند أي أو جميع المواضع ٢٣٤، ٢٣٥، ٢٣٦ و/ أو ٢٣٧ إلى تقليل الألفة لمستقبلات Fcy، على وجه التحديد مستقبل (انظر، مثل، البراءة الأمريكية رقم ٦،٦٢٤،٨٢١). يمكن استخدام استبدال ألانين عند المواضع ٢٣٤، ٢٣٥ و٢٣٧ لـ IgG1 بشري لتقليل وظائف

المؤثر. بشكل اختياري، يتم استبدال المواضع ٢٣٤، ٢٣٦ و/ أو ٢٣٧ في IgG2 البشري بالألانين وموضع ٢٣٥ بالجلوتامين. (انظر، على سبيل المثال، البراءة الأمريكية رقم ٥،٦٢٤،٨٢١). في بعض الجوانب، يتم استخدام طافرة عند واحد أو أكثر من المواضع ٢٤١، ٢٦٤، ٢٦٥، ٢٧٠، ٢٩٦، ٢٩٧، ٣٢٢، ٣٢٩، و ٣٣١ بواسطة ترقيم الاتحاد الأوروبي EU لـ IgG1 بشري. في بعض الجوانب، يتم استخدام طافرة عند واحد أو أكثر من ٣١٨، ٣٢٠، و ٣٢٢ بواسطة ترقيم الاتحاد الأوروبي EU لـ IgG1 بشري. في بعض الجوانب، يكون النمط الممتماثل عبارة عن IgG2 أو IgG4 بشري.

هـ. الأجسام المضادة البشرية

يتم تزويد الأجسام المضادة البشرية المقابلة لـ α-سينوكلين بتقنيات مختلفة موصوفة أدناه. يتم اختيار بعض الأجسام المضادة البشرية بواسطة تجارب ارتباط تنافسية competitive binding experiments، أو بخلاف ذلك، بأن يكون لها نفس القمة اللاصقة أو نوعية قمة لاصقة متراكبة مثل 5C1. يمكن أيضاً فحص الأجسام المضادة البشرية لنوعية قمة لاصقة محددة باستخدام شظية α-سينوكلين فقط (مثل، الوحدات البنائية للحمض الأميني amino acid residues ١١٨-١٢٦) كمولد مناعي immunogen، و/أو بواسطة فحص الأجسام المضادة مقابل مجموعة من طفرات حذف α-سينوكلين. تتمثل إحدى تقنيات إنتاج أجسام مضادة بشرية في طريقة ورم هجين غير متجانس :

(Oestberg et al., Hybridoma 2:361-367 (1983); Oestberg، البراءة الأمريكية رقم ٤٦٣٤٦٦٤؛ و Engleman et al.، البراءة الأمريكية رقم ٤٦٣٤٦٦٦). تتضمن تقنية أخرى تحصين جينات بشرية تعبر وراثياً عن فئران متحورة وراثياً، مثل XenoMouse®، AlivaMab Mouse أو فأر Veloceimmune (راجع، مثل، Lonberg et al.، الطلب الدولي رقم ١٢٢٢/٠٩٣، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٧٧٣٩٧، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٧٤٢٩٩، البراءة الأمريكية رقم ٥٨١٤٣١٨، البراءة الأمريكية رقم ٥٧٨٩٦٥٠، البراءة الأمريكية رقم ٥٧٧٠٤٢٩، البراءة الأمريكية رقم ٥٦٦١٠١٦، البراءة الأمريكية رقم ٥٦٣٣٤٢٥، البراءة الأمريكية رقم ٥٦٢٥١٢٦، البراءة الأمريكية رقم ٥٥٦٩٨٢٥، البراءة الأمريكية رقم ٥٥٤٥٨٠٦، Nature 148, 1547-1553 (1994), Nature Biotechnology 14, 826 (1996),

Kucherlapati، والطلب الدولي رقم ١٠٧٤١/٩١). تتمثل طريقة أخرى في إظهار الخلايا الملتهمة (راجع، على سبيل المثال، Dower et al.، الطلب الدولي رقم ١٧٢٧١/٩١ و McCafferty et al.، الطلب الدولي رقم ٠١٠٤٧/٩٢، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٧٧٢١٨، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٧١٩٠٧، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٥٨٦٥٧، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٣٧٢٤٢، البراءة الأمريكية رقم ٥٧٣٣٧٤٣ والبراءة الأمريكية رقم ٥٥٦٥٣٣٢). في هذه الطرق، يتم إنتاج مجموعات الخلايا الملتهمة حيث تظهر الأعضاء الأجسام المضادة المختلفة على الأسطح الخاصة بها. عادةً ما يتم عرض الأجسام المضادة في صورة شظيات Fv أو Fab. يتم اختيار إظهار الخلايا الملتهمة التي بها أجسام مضادة ذات نوعية مطلوبة بواسطة إغناء الألفة لببتيد α-سينوكلين أو شظية منه. تتمثل تقنية أخرى في عمل متواليات DNA من خلايا B بشرية وفقاً للبروتوكولات المذكورة في :

Reddy et al., Nat Biotechnol. 2010 Sept 28(9):965-9 (Epub 2010 Aug 29) والبراءات الأمريكية رقم ٢٠١١٠٠٥٣٨٠٣، ٢٠١٠٠٠٩٩١٠٣، ٢٠١٠٠٢٩١٠٦٦، ٢٠١٠٠٠٣٥٧٦٣، و٢٠١٠٠١٥١٤٧١. باختصار، يمكن الحصول على خلايا B من إنسان من المتوقع أن يكون به أجسام مضادة لـ α--سينوكلين، مثل، إنسان تم تحصينه بـ α-سينوكلين، شظايا منه، بولي ببتيدات أطول تحتوي على α-سينوكلين أو شظايا منه، أو الأجسام المضادة للأنماط الذاتية. بعد ذلك يتم نسخ mRNA للأجسام المضادة من خلايا B عكسياً وعمل متواليات منها باستخدام، مثل، ٤٥٤ تقنية عمل متواليات. بعد الحصول على متواليات السلاسل من كل جسم مضاد، يمكن عمل أزواج من السلاسل (مثل، استخدام معلومات حيوية bioinformatics)، وعمل نسائل منها، والتعبير عنها وراثياً، وفحص خواصها المطلوبة.

والتعبير الوراثي عن الأجسام المضادة الناتجة عن عودة الارتباط الجيني.

يكون عدد من الطرق معروفاً لإنتاج أجسام مضادة خيمرية chimeric antibodies ومتوافقة مع البشر humanized باستخدام سلالة خلية تعبر وراثياً عن جسم مضاد (مثل، ورم هجين hybridoma). على سبيل المثال، يمكن عمل نسائل من المناطق المتغيرة لجلوبولين مناعي للأجسام المضادة وعمل متواليات منها باستخدام طرق معروفة جيداً. في إحدى الطرق، يتم عمل نسائل للمنطقة VH المتغيرة للسلسلة الثقيلة بواسطة RT -تفاعل السلسلة البوليمري PCR

باستخدام mRNA تم تحضيره من خلايا ورم هجين hybridoma cells. يتم استخدام بادئات توافقية ببتيد رائد leader peptide encompassing لمنطقة VH يتضمن كودون بدء الترجمة كبادئ ٥' ومناطق g2b ثابتة نوعية لبادئ ٣'. تم وصف البادئات التمثيلية نشرة براءة الاختراع الأمريكية رقم ٢٠٠٥/٠٠٠٩١٥٠ لـ Schenk et al. (يُشار إليها فيما يلي في هذه الوثيقة، "Schenk"). يمكن مقارنة المتواليات التي يتم الحصول عليها من نسائل متعددة، مستقة على حدة، لضمان عدم وجود تغييرات أثناء التضخيم. كما يمكن تحديد متوالية منطقة VH أيضاً أو تأكيدها بواسطة عملي متواليات من شظية VH يتم الحصول عليها بواسطة طريقة 5' RACE RT-تفاعل السلسلة البوليمري PCR وبادئ نوعي لـ 3' g2b specific primer.

يمكن عمل نسائل من منطقة VL متغيرة لسلسلة خفيفة بطريقة مماثلة مثل منطقة VH. في طريقة أولى، يتم تصميم بادئ توافقي مُصمم لتضخيم مناطق VL لتهجين منطقة VL تتضمن كودون بدء ترجمة، وبادئ ٣' نوعي لمنطقة Ck بعد منطقة ربط V-J. في طريقة ثانية، يتم استخدام طريقة 5'RACE RT-تفاعل السلسلة البوليمري PCR لعمل نسائل من VL المُشفر لـ cDNA. يتم وصف البادئات التمثيلية في Schenk، أعلاه. بعد ذلك يتم دمج المتواليات التي تم عمل نسائل منها مع المتواليات المُشفرة لمناطق بشرية ثابتة (أو أنواع غير بشرية أخرى). تشتمل المتواليات التمثيلية التي تُشفر مناطق بشرية ثابتة على متوالية رقم :٣٧، التي تُشفر منطقة بشرية ثابتة IgG1، ومتوالية رقم: ٣٩، التي تشفر منطقة ثابتة لكابا بشرية خفيفة السلسلة human kappa light chain.

في إحدى الطرق، تتم إعادة هندسة المناطق المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة والثقيلة لتشفير متواليات مانحة مجدولة بعد موصلات VDJ أو VJ ذات صلة، وعمل نسائل منها في ناقل تعبير وراثي لكائن ثديي، مثل pCMV-hγ1 لسلسلة ثقيلة، وpCMV-Mcl لسلسلة خفيفة. تعمل هذه النواقل على تشفير مناطق ثابتة لـ γ1 وCk بشري كشظايا إكسونية بعد مجموعات المنطقة المتغيرة التي تم إدخالها. بعد التحقق من المتوالية، يمكن نقل العدوى بشكل مشترك إلى نواقل التعبير الوراثي لسلسلة ثقيلة وسلسلة خفيفة في خلايا CHO لإنتاج الأجسام المضادة الخيمرية. يتم تجميع الأوساط المهيأة بعد ٤٨ ساعة من نقل العدوى وتم اختبارها بواسطة تحليل بقعة وسترن لإنتاج

جسم مضاد أو اختبار فحص الأنزيم المرتبط مناعياً ELISA لربط مولد الضد. يتم جعل الأجسام المضادة الخيمرية متوافقة مع البشر على النحو الموصوف أعلاه.

يتم نمطياً إنتاج أجسام مضادة خيمرية، مكسوة بقشرة خارجية، متوافقة مع البشر، وبشرية بواسطة التعبير الوراثي الناتج عن عودة الارتباط الجيني. تشتمل بنيات حمض نووي ناتجة عن عودة الارتباط الجيني نمطياً على متوالية تحكم في التعبير الوراثي مرتبطة بفاعلية بالمتواليات التي تشفر سلاسل الجسم المضاد، بما في ذلك المرتبطة بصورة طبيعية أو عنصر (عناصر) مختلفة التكوين للتحكم في التعبير الوراثي، مثل معزز. فور دمج الناقل في العائل المناسب، يتم الحفاظ على العائل في هذه الظروف المناسبة للتعبير الوراثي عن متواليات النوكليوتيد، وتجميع وتنقية الأجسام المضادة المتفاعلة تبادلياً.

نمطياً تكون نواقل التعبير الوراثي قابلة للنسخ في الكائنات العائلة host organisms إما في صورة إيبسومات episomes أو في صورة جزء متكامل من DNA الكروموسومي لعائل host chromosomal DNA. بصفة عامة، تحتوي نواقل التعبير الوراثي على مرقمات اختيار selection markers، مثل، مقاوم الأمبيسيلين ampicillin-resistance أو مقاوم الهيجروميسين hygromycin-resistance، للسماح بالكشف عن هذه الخلايا المحولة بواسطة متواليات DNA مطلوبة.

تكون الإشرشيا كولاي E. coli عبارة عن عائل بدائي النواة prokaryotic host مفيد في عمل نسائل cloning من متواليات DNA التي تُشفر بولى ببتيدات polypeptides التي تم الكشف عنها هنا. تكون الميكروبات، مثل الخميرة مفيدة أيضاً في التعبير الوراثي. تكون السكيراء saccharomyces عبارة عن عائل خميرة yeast host، به نواقل مناسبة بها متواليات تحكم في التعبير الوراثي، منشأ النسخ، متواليات إنهاء وما شابه على النحو المطلوب. تشتمل المعززات النمطية على إنزيم 3-phosphoglycerate kinase وإنزيمات أخرى حالة للسكر glycolytic enzymes. تشتمل معززات الخميرة القابلة للحث yeast promoters، من ضمن أمور أخرى، على معززات promoters من كحول ديهيدروجيناز alcohol dehydrogenase، سيتوكروم متماثل isocytochrome C، وإنزيمات مسئولة عن استخدام المالتوز maltose وجالاكتوز galactose.

تكون خلايا ثديية mammalian عبارة عن خلية عائلة للتعبير الوراثي عن أجزاء النوكليوتيد المُشفرة لجلوبولينات مناعية nucleotide segments encoding immunoglobulins أو شظايا منه. راجع Winnacker, From Genes to Clones, (VCH Publishers, NY, 1987). تم تطوير عدد من سلالات خلية عائلة مناسبة قادرة على إفراز بروتينات سليمة مختلفة التكوين، وتشتمل على سلالات خلية CHO cell lines، سلالات خلية COS مختلفة، خلايا HeLa، خلايا L، خلية كلية بشرية جنينية human embryonic kidney cell، وسلالات خلية ورم نخاعي myeloma cell lines. يمكن أن تكون الخلايا غير بشرية. يمكن أن تشتمل نواقل التعبير الوراثي لهذه الخلايا على متواليات تحكم في التعبير الوراثي، مثل منشأ النسخ، معزز، مُحسن ((Queen et al., Immunol. Rev. 89:49 (1986))، ومواضع ضرورية لمعالجة البيانات، مثل مواضع ربط ريبوسوم ribosome binding sites، مواضع جدل RNA splice sites، مواضع معالجة ببعَدِيْد الأدينيلات polyadenylation sites، ومتواليات إنهاء النسخ transcriptional terminator sequences. يمكن أن تشتمل متواليات تحكم في التعبير الوراثي مشتقة من جينات داخلية endogenous genes، الفيروس المضخم للخلايا cytomegalovirus، SV40، الفيروس الغدي adenovirus، فيروس الورم الحليمي البقري bovine papillomavirus، وما شابه. راجع (1992) 148:1149 .J. Immunol.

على نحو بديل، يمكن تضمين متواليات تشفير جسم مضاد antibody coding sequences في جينات ناقلة لإدخالها في جينوم حيوان متحور وراثياً genome of transgenic animal وتعبير وراثي لاحق في حليب حيوان متحور وراثياً milk of the transgenic animal (راجع، على سبيل المثال، البراءة الأمريكية رقم ٥٧٤١٩٥٧، البراءة الأمريكية رقم ٥٣٠٤٤٨٩، البراءة الأمريكية رقم ٥٨٤٩٩٩٢). تشتمل جينات ناقلة مناسبة على متواليات تشفير سلاسل خفيفة و/أو ثقيلة في رابطة فعالة مع معزز ومحسن من جين نوعي لغدة كائن ثديي، مثل لاكتو جلوبيولين كازيين أو بيتا beta lactoglobulin.

يمكن نقل النواقل التي تحتوي على أجزاء DNA محل الاهتمام في الخلية العائلة بواسطة طرق تعتمد على نوع العائل الخلوي. على سبيل المثال، عادةً ما يتم استخدام لنقل العدوى بكلوريد الكالسيوم calcium chloride لخلايا بدائية النواة prokaryotic cells، بينما يمكن يتم استخدام

العلاج بالفوسفات calcium phosphate treatment، التوصيل الكهربائي electroporation، حقن دهني lipofection، نقل العدوى أساسه القذف البيولوجي biolistics transfection أو الفيروسات viral لعائل خلوي آخر. تشتمل طرق أخرى مستخدمة لتحويل خلايا كائن ثديي على استخدام بولي برين polybrene، اندماج خلية غير نوعية protoplast fusion، جسيمات دهنية liposomes، التوصيل الكهربائي electroporation وحقن بالممص الدقيق microinjection. لإنتاج حيوانات متحورة وراثياً transgenic animals، يمكن حقن جينات ناقلة بالممص الدقيق في خلايا بيضية ملقحة fertilized oocytes، أو يمكن تضمينها في جينوم خلايا جذعية جنينية genome of embryonic stem cells، ويتم نقل نويات هذه الخلايا في خلايا بيضية مستأصلة بالكامل enucleated oocytes.

بإدخال ناقل (نواقل) مُشفرة للسلاسل الثقيلة والخفيفة للجسم المضاد في مزرعة خلية، يمكن فحص مجموعات الخلية بالنسبة لناتج النمو وجودة المنتج في أوساط خالية من المصل. بعد ذلك يمكن إخضاع مجموعات الخلية ذات أعلى إنتاج لعملية عمل نسائل لخلية مفردة أساسها FACS لتوليد سلالات أحادية النسيلة. يمكن استخدام قيمة إنتاج خاصة أعلى من ٥٠ بيكو جرام أو ١٠٠ بيكو جرام لكل خلية في اليوم، وهو ما يعتبر مناظر لقيم معايرة منتج أكبر من ٧,٥ جم/لتر خلية. كما يمكن اختبار الأجسام المضادة التي تم إنتاجها بواسطة نسائل خلية مفردة بالنسبة للتعكر، خواص الترشيح، PAGE، IEF، فحص بالأشعة فوق البنفسجية، HP-SEC، تعيين كربوهيدرات-أوليجو سكاريد carboydrate-oligosaccharide mapping، مقياس الطيف الكتلي massالتصوير الطبي بأشعة جاما SPECTrometery، واختبار الارتباط binding assay، مثل اختبار فحص الأنزيم المرتبط مناعياً ELISA أو Biacore. بعد ذلك يمكن تخزين نسائل تم اختيارها في قنينات متعددة وتخزينها مجمدة للاستخدام اللاحق.

فور التعبير الوراثي عنها، يمكن تنقية الأجسام المضادة وفقاً لإجراءات قياسية خاصة بالمجال، بما في ذلك احتجاز البروتين A، تنقية الكروماتواف السائل عالي الأداء high performance liquid chromatography (HPLC)، عمود كروماتوجراف column chromatography، نقل الهلام كهربائيًا gel electrophoresis وما شابه (راجع بصفة عامة:

(Scopes, Protein Purification (Springer-Verlag, NY, 1982).

يمكن استخدام طريقة للإنتاج التجاري للأجسام المضادة، بما في ذلك تحسين الكودون، اختيار معززات، عناصر نسخ، وعوامل إنهاء، عمل نسائل من خلية مفردة خالية من المصل، تخزين الخلايا، استخدام مرقمات اختيار لتضخيم رقم نسخة، عامل إنهاء، عمل نسائل من خلية مفردة خالية من المصل، تحسين عيارات بروتين (راجع، على سبيل المثال، البراءة الأمريكية رقم ٥٧٨٦٤٦٤، البراءة الأمريكية رقم ٦١١٤١٤٨، البراءة الأمريكية رقم ٦٠٦٣٥٩٨، البراءة الأمريكية رقم ٧٥٦٩٣٣٩، الطلبات الدولية رقم ٠٥٠٨٨٤/٠٢٠٠٤، ٠١٢١٤٢/٠٢٠٠٨، ٠١٢١٤٢/٠٢٠٠٨، ٠١٩٤٤٢/٠٢٠٠٥، ١٠٧٣٨٨/٠٢٠٠٨، و ٠٢٧٤٧١/٠٢٠٠٩، والبراءة الأمريكية رقم ٥٨٨٨٨٠٩).

ز. اختبارا فحص جسم مضاد

يمكن إخضاع الأجسام المضادة لعمليات فحص متعددة بما في ذلك اختبارات ارتباط، عمليات فحص وظيفية، عمليات فحص في نماذج حيوان لأمراض مصاحبة لرواسب α-سينوكلين، وتجارب سريرية. اختبارات الارتباط الخاصة بالارتباط النوعي specific binding، وبشكل اختياري، الألفة ونوعية قمة لاصقة بـ α-سينوكلين (أو شظية منه، مثل الوحدات البنائية للحمض الأميني ١١٨-١٢٦). يتم إجراء عمليات الفحص المذكورة في بعض الأحيان بالتنافس مع جسم مضاد توضيحي مثل 5C1. بشكل اختياري، يتم تثبيت إما هدف الجسم المضاد أو α-سينوكلين في هذا الاختبار. يمكن إجراء الاختبارات الوظيفية في نماذج خلوية بما في ذلك الخلايا التي تُعبر وراثياً بصورة طبيعية عن α-سينوكلين أو التي يتم نقل العدوى إليها بواسطة DNA مُشفر بـ α-سينوكلين أو شظية منه. تشتمل الخلايا المناسبة على خلايا عصبية neuronal cells. يمكن فحص الخلايا بالنسبة لمستويات منخفضة من α-سينوكلين (مثل، بواسطة بقعة وسترن أو الترسيب المناعي immunoprecipitation لنواتج استخلاص الخلية أو المواد الطافية)، مستويات منخفضة من α-سينوكلين متكتل (مثل، بواسطة طرق كيميائية هيستولوجية مناعية immunohistochemical و/أو ذات بؤرة واحدة)، و/أو سمية منخفضة بسبب α-سينوكلين.

تعمل عمليات فحص نموذج الحيوان على اختبار قدرة الجسم المضاد على علاجياً أو وقائياً على علاج علامات أو أعراض في نموذج حيوان يحاكي مرض بشري مصاحب لرواسب α-سينوكلين، مثل مرض جسم ليوي. تشتمل العلامات أو الأعراض التي يمكن مراقبتها على توازن وتناسق

الحركة والخلل المعرفي. يمكن تحديد مدى القصور بواسطة المقارنة مع عينة مقارنة مناسبة، مثل توازن وتناسق الحركة والخلل المعرفي في حيوانات مستخدمة كعينة مقارنة والتي يتم إعطائها جسم مضاد مستخدم في عينة مقارنة (مثل، جسم مضاد مستخدم في عينة مقارنة مطابق لنمط مماثل)، علاج إرضائي placebo، أو بدون علاج على الإطلاق. يمكن لحيوانات متحورة وراثياً أو نماذج حيوانات أخرى أمراض جسم ليوي أن تعبر وراثياً عن جين α-سينوكلين ناقل بشري. لتسهيل الاختبار في نماذج الحيوانات، يمكن استخدام الأجسام المضادة التي تشتمل على المنطقة الثابتة المناسبة لنموذج حيوان. يمكن استنتاج أن النسخة المتوافقة مع البشر للجسم المضاد ستكون فعالة إذا كان الجسم المضاد الفأري أو الجسم المضاد الخيمري المكافئ فعال في نموذج حيواني ملائم ويكون للجسم المضاد المتوافق مع البشر ألفة ارتباط مماثلة (مثل، بعامل يبلغ ١,٥، ٢ أو ٣، في خطأ التجريب).

تعمل التجارب السريرية على اختبار الأمان والفاعلية في إنسان يعاني من مرض مصاحب لرواسب α-سينوكلين.

ح. أحماض نووية nucleic acids

يوفر الاختراع أيضاً أحماض نووية مُشفرة لأي من السلاسل الثقيلة والخفيفة الموصوفة أعلاه. نمطياً، تعمل الأحماض النووية أيضاً على تشفير متوالية إشارة مدمجة مع السلاسل الثقيلة والخفيفة الناضجة. تشتمل الأمثلة المناسبة لببتيدات إشارة على الوحدات البنائية للحمض الأميني ١-١٩ لمتوالية رقم: ٦ (المُشفرة بواسطة نوكليوتيدات ١-٥٧ لمتوالية رقم: ٥) والوحدات البنائية للحمض الأميني ١-١٩ لمتوالية رقم: ٨ (المُشفرة بواسطة نوكليوتيدات ١-٥٧ لمتوالية رقم: ٧). يمكن أن يكون تشفير المتواليات على أحماض نووية عبارة عن رابطة غير فعالة مع المتواليات التنظيمية regulatory sequences لضمان التعبير الوراثي عن متواليات التشفير، مثل معزز promoter، محسن enhancer، موضع ربط ريبوسوم ribosome binding site، إشارة إنهاء نسخ وما شابه. يمكن أن تظهر الأحماض النووية المُشفرة للسلاسل الثقيلة والخفيفة في صورة معزولة يمكن عمل نسائل منها في واحد أو أكثر من النواقل. يمكن تخليق الأحماض نووية بواسطة على سبيل المثال، التخليق في الحالة الصلبة أو تفاعل السلسلة البوليمري polymerase chain reaction (PCR) لأوليجو نوكليوتيدات متراكبة overlapping oligonucleotides.

يمكن ربط الأحماض النووية المُشفرة للسلاسل الثقيلة والخفيفة في صورة حمض نووي واحد متجاور، مثل، في ناقل تعبير وراثي، أو يمكن أن تكون منفصلة، مثل، يتم عمل نسائل من كل منها في ناقل التعبير الوراثي الخاص بها.

٥. التطبيقات العلاجية

يوفر الاختراع طرق متعددة لعلاج أو الوقاية من أمراض جسم ليوي في مرضى يعانون من خطر الإصابة بمثل هذا المرض. يتضمن المرضى الذين يستجيبون للعلاج الأفراد المعرضون لخطر الإصابة بمرض جسم ليوي Lewy Body Disease (LBD) ولكن لا يظهر عليهم أعراض، كما يظهر المرضى في الوقت الحالي أو يظهرون في وقت باكر علامات تحذيرية لمسببات المرض سينوكلين، على سبيل المثال، بطء EEG، المظاهر العصبية والنفسية neuropsychiatric manifestations (الاكتئاب depression، الخرف dementia، الهلوسة hallucinations، القلق anxiety، اللامبالاة apathy، انعدام التلذذ anhedonia)، والتغيرات اللاإرادية autonomic changes (انخفاض ضغط الدم الانتصابي orthostatic hypotension، اضطرابات المثانة bladder disturbances، الإمساك constipation، سلس البول الغائط fecal incontinence، الإلعاب sialorrhea، عسر البلع dysphagia، العجز الجنسي sexual dysfunction، التغيرات في تدفق الدم إلى المخ cerebral blood flow)، التغيرات الحسية sensory changes (حاسة الشم olfactory، الألم pain، اضطرابات تمييز الألوان color discrimination abnormal sensations)، اضطرابات النوم sleep disorders (اضطراب سلوك النوم sleep behavior disorder (RBD)، متلازمة تململ الساقين restless legs syndrome / حركات أقصى الدورية periodic extremity movements، فرط النوم hypersomnia، الأرق insomnia) وعلامات أخرى متنوعة وأعراض (التعب fatigue، الشفع diplopia، عدم وضوح الرؤية، المث، فقدان/اكتساب الوزن). لذلك، يمكن إعطاء الطرق الحالية على نحو وقائي للأفراد الذين لديهم خطر وراثي معروف للإصابة بمرض جسم ليوي (LBD). يشمل هؤلاء الأفراد الذين لهم أقارب عانوا من هذا المرض، وتلك التي يتم تحديدها من خلال تحليل العلامات الوراثية genetic markers أو البيوكيميائية biochemical.

تشمل العلامات الوراثية من خطر نحو مرض باركنسون PD طفرات في جينات α-سينوكلين أو

باركين Parkin. ولا سيما الطفرات في المواقع ٣٠ و ٥٣ لجين α-سينوكلين. الأفراد الذين يعانون حاليًا من مرض باركنسون PD يمكن التعرف عليهم من المظاهر الأكلينيكية clinical manifestations التي تشمل رعاش الراحة resting tremor وصلابة العضلات muscular rigidity وبطء الحركة bradykinesia وعدم الاستقرار الوضعي postural instability.

في المرضى الذين يعانون من مرض غير مصحوب بأعراض، يمكن أن يبدأ العلاج عند أي عمر (مثل، ١٠، ٢٠، ٣٠). عادةً، مع هذا، من غير الضروري بدء العلاج إلى أن يبلغ المريض ٤٠، ٥٠، ٦٠ أو ٧٠. يتضمن العلاج نمطيًا جرعات متعددة على مدى فترة من الزمن. يمكن مراقبة العلاج عن طريق فحص الجسم المضاد، أو خلايا T منشطة أو حالات استجابة خلايا B إلى العامل العلاجي (مثل، صورة مبتورة truncated form من ببتيد α-سينوكلين) مع الوقت. في حال انخفاض الاستجابة، تتم الإشارة إلى جرعة معزِّزة booster dosage.

يوفر الاختراع طرق لعلاج أو الوقاية من لمرض جسم ليوي في مريض عن طريق إعطاء تركيبات جسم مضاد في هذه الظروف الذي يولِّد استجابة علاجية مفيدة في المريض (مثل، تقليل التكتلات المتعلقة بالتهاب الأعصاب neuritic aggregates و/أو ألفا سينوكلين المحوري العصبي axonal alpha synuclein، تقليل الضمور المتعلق بالتهاب الأعصاب neuritic dystrophy ، تحسين الوظيفة الإدراكية cognitive function ، و/أو عكس، علاج أو منع التدهور المعرفي inhibiting cognitive decline) في المريض. في بعض الطرق، يمكن تقليل مناطق الضمور المتعلق بالتهاب الأعصاب في اللبد العصبي من القشرة المخية الحديثة و/أو العقد القاعدية basal ganglia بنسبة ١٠٪، ٢٠٪، ٣٠٪، ٤٠٪ أو أكثر مقارنة بعينة المقارنة.

العجز الادراكي cognitive impairment ، وانخفاض التدريجي في الوظيفة المعرفية، والتغييرات في مورفولوجية الدماغ brain morphology ، والتغييرات في الوظيفة الدماغية cerebrovascular function الملحوظة بدرجة شائعة في المرضى الذين يعانون من أو المعرضين لخطر الإصابة بمرض ليوي الجسم. يوفر اختراع طرق منع انخفاض وظيفة الادراك في مثل هؤلاء المرضى.

يوفر هذا الاختراع أيضًا طرق للمحافظة على أو زيادة كثافة التشابك synaptic density و/أو كثافة التغصن dentritic density. يمكن قياس مؤشر التغيرات في كثافة التشابك أو التغصن بواسطة علامات تشكيل الصولة العصبية (سينابتوفيزين) synapse formation (synaptophysin) و/أو التغصنات dendrites (MAP2). في بعض الطرق، يمكن استعادة كثافة التشابك أو التغصن إلى مستوى كثافة التشابك أو التغصن في خاضع صحيح. في بعض الطرق، يمكن أن يكون مستوى كثافة التشابك أو التغصن في المريض مرتفعًا بنسبة ٥٪، ١٠٪، ١٥٪، ٢٠٪، ٢٥٪، ٣٠٪ أو أكثر مقارنة بعينة المقارنة.

٦. التركيبات الصيدلانية وطرق العلاج

في التطبيقات الوقائية، يتم إعطاء الجسم المضاد أو التركيبة الصيدلانية نفسها لمريض معرَّض لـ، أو معرَّض لخطر الإصابة بمرض في نظام (الجرعات والتكرار ومسار الإعطاء) فعَّال للحد من المخاطر، والتقليل من شدة، أو تأخير ظهور علامة أو عرض واحد على الأقل للمرض. في بعض التطبيقات الوقائية، يكون النظام فعَّالاً لتثبيط أو تأخير تراكم ألفا سينوكلين والشظايا المبتورة في الدماغ brain truncated fragments ، و/أو تثبيط أو تأخير الآثار السامة و/أو تثبيط و/أو تأخير تطور العجز السلوكي behavioral deficits. في التطبيقات العلاجية، يتم إعطاء جسم مضاد لمريض يشتبه في إصابته، أو يعاني بالفعل من أمراض جسم ليوي في نظام (خاص بالجرعات وتكراراها التردد ومسار الإعطاء) فعَّال لتحسين أو على الأقل تثبيط المزيد من تدهور في علامة أو عرض واحد على الأقل لهذا المرض. في بعض التطبيقات العلاجية، يكون النظام فعَّالاً في الحد من أو على الأقل تثبيط حدوث زيادة مستويات ألفا سينوكلين والشظايا المبتورة، وحالات التسمم المصاحبة و/أو العجز السلوكي.

يعتبر النظام فعَّال علاجيًا أو وقائيًا إذا كان حقَّق المريض المعالج نتيجة أفضل من النتائج المتوسطة في مرضى عينة مقارنة الذين لم يتم علاجهم بطرق الاختراع، أو إذا أظهر النظام نتائج أكثر إيجابية في المرضى الذين تم علاجهم مقارنة بمرضى عينة المقارنة في التجارب الأكلينيكية المتحكم بها (على سبيل المثال، المرحلة II، المرحلة III / II أو المرحلة III) في الصفحة <٠,٠٥ أو ٠,٠١ أو حتى ٠,٠٠١ مستوى.

تختلف الجرعات الفعَّالة تبعًا لعوامل كثيرة مختلفة، بما في ذلك وسائل الإعطاء، الموقع المستهدف، الحالة الفسيولوجية للمريض بما في ذلك نوع مرض جسم ليوي، وما إذا كان المريض سواء كان المريض إنسان أو حيوان، والأدوية الأخرى التي يتم إعطاؤها، وإذا ما كان العلاج بغرض الوقائية أو العلاج.

تتراوح الجرعة المثالية للأجسام المضادة من حوالي ٠,٠١-٥ مجم/كجم، وغالبًا ٠,١-٣ مجم/كجم أو،١٥-٢ مجم/كجم أو،١٥-١,٥ مجم/كجم من وزن جسم المريض. يمكن إعطاء الأجسام المضادة بهذه الجرعات يوميًا، على أيام متبادلة وأسبوعيًا ونصف شهريًا وشهريًا وفصليًا، أو وفقًا لأي جدول آخر يحدده التحليل التجريبي. يتضمن العلاج التمثلي الإعطاء بجرعات متعددة على مدى فترة طويلة، على سبيل المثال، لا تقل عن ستة أشهر. تتضمن أنظمة العلاج التمثيلية الإضافية الإعطاء مرة واحدة كل أسبوعين أو مرة في الشهر أو مرة واحدة كل ٣ إلى ٦ أشهر.

يمكن إعطاء الأجسام المضادة عبر مسار طرفي (أي، مسار يتم فيه إعطاء أو عبور جسم مضاد تم حثه حاجز الدم في الدماغ للوصول إلى الموقع المقصود في الدماغ. تتضمن طرق الإعطاء الموضعي، عن طريق الوريد، عن طريق الفم، تحت الجلد، عن طريق الشريان، داخل الجمجمة، داخل القراب، داخل الصفاق، الأنف أو العضل. تتمثل بعض طرق إعطاء الأجسام المضادة في الإعطاء عن طريق الوريد وتحت الجلد. غالبًا ما يتم هذا النوع من الحقن في عضلات الذراع أو الساق. في بعض الطرق، يتم حقن الأجسام المضادة مباشرة في أنسجة معينة حيث تتراكم الترسبات، على سبيل المثال الحقن داخل الجمجمة.

يمكن أن تكون التركيبات الصيدلانية للإعطاء عن طريق الوريدي معقمة ومتساوي التوتر إلى حدٍ كبير وتم تصنيعها في ظل ظروف يمكن توفير التركيبات الدوائية في شكل وحدة جرعة (أي جرعة لإعطاء المنفرد). يمكن صياغة التركيبات الدوائية باستخدام واحد أو أكثر مقبول من الناحية الفسيولوجية من المواد الحاملة، المواد المخفِّفة والسواغات أو المواد المساعدة. تعتمد الصياغة على طريقة الإعطاء التي تم اختيارها. من أجل الحقن، يمكن صياغة الأجسام المضادة في محاليل مائية aqueous solutions ، ويفضل في محاليل منظمة متوافقة من الناحية الفسيولوجية مثل محلول هانك Hank's solution ، ومحلول رينجر Ringer's solution ، أو المحلول الملحي الفسيولوجي physiological saline أو محلول أستيات منظم acetate buffer (لتقليل عدم

الراحة في موقع الحقن). يمكن أن يحتوي المحلول على عوامل صياغة formulatory agents من دستور الأدوية مثل عوامل تعليق suspending ، وتثبيت stabilizing و/أو تشتيت dispersing. بدلاً من ذيك يمكن أن تكون الأجسام المضادة قبل الاستخدام في صورة مجففة بالتجميد لتكوينها باستخدام مادة ناقلة مناسبة، على سبيل المثال، ماء معقَّم خالي من المادة المولِّدة للحمى pyrogen.

يمكن إعطاء الأنظمة الحالية بالاشتراك مع عامل آخر فعَّال في علاج أو الوقاية من المرض يتم علاجه. على سبيل المثال، في حالة مرض باركنسون PD، يمكن استخدام علاج مناعي ضد ألفا سينوكلين في الطلب الدولي رقم ٢٠٠٨/١٠٣٤٧٢، ليفودوبا Levodopa ، مولدات ضد دوبامين dopamine agonists ، مثبطات COMT inhibitors ، مثبطات MAO-B inhibitors ، أمانتادين Amantadine ، أو عوامل مضادة للكولين anticholinergic agents يمكن استخدامها في تركيبة مع الأنظمة الحالية.

٧. التطبيقات الأخرى

يمكن استخدام الأجسام المضادة المذكورة أعلاه للكشف عن α-سينوكلين في سياق التشخيص أو العلاج أو في البحوث الأكلينيكية. ويمكن أيضًا بيع الأجسام المضادة مثل كواشف البحث للبحوث المختبرية في خلايا كشف تحمل α-سينوكلين واستجابتها للمؤثرات المختلفة. في مثل هذه الاستخدامات، يمكن ترقيم الأجسام المضادة وحيدة النسيلة بجزيئات فلورية fluorescent molecules ، جزيئات مرقمة دوَّارة spin-labeled molecules ، والإنزيمات enzymes أو النظائر المشعة radioisotypes ، ويمكن توفيرها في شكل طقم به جميع الكواشف اللازمة لأداء فحص لα-سينوكلين. يمكن أيضًا استخدام الأجسام المضادة لتنقية α-سينوكلين، على سبيل المثال، من خلال التقارب اللوني.

يمكن استخدام الأجسام المضادة للكشف عن أجسام ليوي LBs في المريض. تعد هذه الطرق هي مفيدة لتشخيص أو التأكد من تشخيص مرض باركنسون PD، أو مرض آخر مرتبط بوجود أجسام ليوي LBs في الدماغ، أو الاشتباه في الإصابة بها. على سبيل المثال، الطرق الممكن استخدامها على المريض يظهر أعراض الخرف. إذا كان المريض يعاني من أجسام ليوي LBs، من المرجح

أن يعاني المريض من مرض جسم ليوي، مثل مرض باركنسون. ويمكن أيضًا استخدام الطرق على المرضى الذين يعانون من أعراض. يشير وجود أجسام ليوي أو ترسبات غير طبيعية أخرى من α-سينوكلين إلى الاشتباه في الإصابة بالمرض في المستقبل. تعد الطرق مفيدة أيضًا في رصد تطور المرض و/أو الاستجابة للعلاج في المرضى الذين تم تشخيص إصابتهم بمرض جسم ليوي سابقًا.

يمكن إجراء الطرق عن طريق إعطاء جسم مضاد ومن ثم الكشف عن الأجسام المضادة بعد ارتباطها. عند الرغبة في ذلك، يمكن تجنب استجابة الخلوص باستخدام شظية جسم مضاد يفتقر إلى المنطقة ثابتة كاملة الطول، مثل Fab. في بعض الطرق، يمكن أن يعمل الجسم المضاد نفسه ككاشف علاج وتشخيص على حدٍ سواء.

من أجل التشخيص (على سبيل المثال، في تصوير الجسم الحي)، يمكن إعطاء الأجسام المضادة عن طريق الحقن في الوريد في جسم المريض، أو مباشرةً في الدماغ عن طريق الحقن داخل الجمجمة أو عن طريق حفر حفرة من خلال الجمجمة. يجب أن تكون جرعة الكاشف ضمن نفس نطاقات طرق العلاج. عادةً، يتم ترقيم الأجسام المضادة، على الرغم أنه في بعض الطرق، تتم إزالة ترقيم الجسم المضاد واستخدام عامل ترقيم ثانوي لربط الجسم المضاد. يعتمد اختيار الترقيم على وسائل الكشف. على سبيل المثال، يعد الترقيم الفلوري مناسبًا للكشف البصري. يعد استخدام الترقيم البارامغنطيسي مناسبً للكشف الشعاعي الطبقي بدون تدخل جراحي. يمكن أيضًا الكشف عن الترقيمات المشعة باستخدام التصوير المقطعي بالإصدار البوزيتروني Positron emission tomography (PET) أو التصوير الطبي بأشعة جاما Single-photon emission computed tomography (SPECT).

يتم إجراء التشخيص من خلال مقارنة عدد وحجم و/أو شدة المواضع المرقمة لقيم خط القاعدة المناظرة. يمكن أن تمثل قيم خط القاعدة المستويات المتوسطة في عينة من الأفراد غير المصابين بالمرض. يمكن أيضًا لقيم خط القاعدة أن تمثل مستويات سابقة تم تحديدها في المريض نفسه. على سبيل المثال، يمكن تحديد قيم خط القاعدة في المريض قبل بدء العلاج، ومن ثم مقارنة القيم المقاسة بقيم خط القاعدة. يشير الانخفاض في القيم بالنسبة لخط القاعدة إلى الاستجابة الإيجابية للعلاج.

يمكن استخدام الأجسام المضادة لتوليد الأجسام المضادة لمكافحة النمط الذاتي. (انظر، على سبيل المثال، Greenspan & Bona, FASEB J. 7(5) :437-444, 1989; and Nissinoff, J. Immunol. 147:2429-2438, 1991). ويمكن استخدام هذه الأجسام المضادة لمكافحة النمط الذاتي في دراسات الحركة الدوائية، الدَّينامِيكا الدوائية، والتوزيع الحيوي وكذلك في دراسات استجابات الجسم المضاد الأكلينيكي المأخوذ من البشر والمضاد للبشر human-anti-human antibody (HAHA) في أفراد تم علاجهم بالأجسام المضادة. على سبيل المثال، يمكن استخدام الأجسام المضادة المقاومة للأنماط الذاتية التي ترتبط تحديدًا بمنطقة متغيرة من الأجسام المضادة 5C1 المتوافقة مع البشر وبالتالي يمكن استخدامها للكشف عن الأجسام المضادة 5C1 المتوافقة مع البشر في دراسات الحركة الدوائية وتساعد على تحديد كمية استجابات الجسم المضاد المأخوذ من البشر والمضاد للبشر (HAHA) في الأفراد الذين تمت معالجتهم.

٨. الأطقم

تم أيضًا تقديم أطقم تتضمن جسم مضاد نوعي α-سينوكلين وتعليمات للاستخدام. يمكن استخدام هذه الأطقم في، على سبيل المثال، تنفيذ طرق التشخيص الموصوفة أعلاه. ويمكن أيضًا أن يتضمن الطقم ترقيم. يمكن أيضًا أن تحتوي الأطقم عادةً على ترقيم يقدم تعليمات لاستخدام الطقم. يمكن أن يشمل الترقيم أيضًا مخطَّط أو المستويات المناظرة الأخرى لنظام ذو صلة بالترقيم المقاس بمستويات الأجسام المضادة لـ α-سينوكلين. يشير مصطلح الترقيم عمومًا إلى أي مادة مكتوبة أو مسجلة يتم إلحاقها، أو ترافق الطقم في أي وقت خلال تصنيعه، نقله وبيعه أو استخدامه. على سبيل المثال، يشمل مصطلح ترقيم المنشورات الدعاية والكتيبات ومواد التعبئة والتغليف والتعليمات وأشرطة الصوت أو الفيديو، وأقراص الكمبيوتر، وكذلك الكتابة المطبوعة مباشرة على الأطقم.

تم أيضًا تقديم أطقم تشخيصية لإجراء تصوير الجسم الحي. تحتوي هذه الأطقم عادةً على جسم مضاد يرتبط بقمة لاصقة من α-سينوكلين بحسب ما هو موصوف هنا. يمكن ترقيم الجسم المضاد أو تضمين كاشف ترقيم ثانوي في الطقم. يمكن أن يشمل الطقم تعليمات لإجراء فحص تصوير في الجسم الحي.

تم تضمين جميع إجراءات إيداع البراءة، الموقع الإليكتروني، المنشورات الأخرى، أرقام الوصول وما شابه ذلك المذكورة أعلاه أو أدناه بالكامل لجميع الأغراض بالقدر نفسه كما لو أنه تم الإشارة إلى كل عنصر تحديدًا وبشكل فردي ليتم تضمينه كمرجع. في حال ارتباط إصدارات مختلفة من متوالية برقم وصول بعدد مختلف من المرات، فإنه يقصد النسخة المرتبطة بعدد الوصول في تاريخ الايداع الفعَّال للطلب الحالي. يعني التاريخ الفعلي للإيداع وقت سابق من تاريخ الإيداع الفعلي أو تاريخ ايداع طلب ذو أولوية بالإشارة إلى رقم الوصول عند الحاجة. وبالمثل في حال نشر إصدارات مختلفة من منشور، موقع إليكتروني أو ما شابه ذلك في أوقات مختلفة، تتم الإشارة إلى النسخة المنشورة مؤخرًا في التاريخ الفعلي لإيداع الطلب ما لم يذكر خلاف ذلك. أي ميزة، خطوة، عنصر، نموذج، أو جانب من جوانب هذا الاختراع يمكن استخدامها في تركيبة مع أي دولة أخرى ما لم يذكر خلاف ذلك على وجه التحديد. على الرغم من وصف الاختراع الحالي ببعض التفصيل عن طريق التوضيح والتمثيل بغرض تحقيق الوضوح والفهم، فإنه من الواضح إمكانية ممارسة تغييرات وتعديلات معينة في نطاق عناصر الحماية.

أمثلة

مثال ١: عزل 5C1 فأري

تم توليد جسم مضاد 5C1 فأري في فأر تم حقنه بمترافق ببتيد يتضمن جين مناعي ببتيدي VDPDNEAYEGGC(متوالية رقم: ١٤) المقترن بـ جسم مضاد مأخوذ من ماشية مضاد لفأر. يكون الببتيد، الذي يتضمن الوحدات البنائية ١١٨-١٢٦ لـ α -سينوكلين المدمجة مع الببتيد GGC عند الطرف C، مقترن بجسم مضاد مأخوذ من ماشية مضاد لفأر من خلال رابط ماليميد maleimide linker المرتبط بوحدة بنائية من السيستين عند الطرف C-terminal cysteine residue.

مثال ٢: التحصين السلبي باستخدام الأجسام المضادة α-سينوكلين

لاختبار تأثير الأجسام المضادة α-سينوكلين على النموذج الحيواني لمرض جسم ليوي، تم استخدام العديد من الأجسام المضادة α-سينوكلين لتحصين الفئران سلبياً. تم استخدام انثى فئران

تبلغ من العمر ٣-٤ أشهر من النمط البري، تعطيل α-سينوكلين، والمحور وراثياً بـα-سينوكلين (سلالة ٦١) (n=١٤/مجموعة). تم تضمين الأجسام المضادة المختبرة :

9E4 (IgG1، قمة لاصقة: الأحماض الأمينية ١١٨-١٢٦ لـα -سينوكلين)؛

5C1(IgG1، جين مناعي: الأحماض الأمينية ١١٨-١٢٦ لـα -سينوكلين، رابط-cys)؛

5D12(IgG2) ، جين مناعي: الأحماض الأمينية ١١٨-١٢٦ لـα -سينوكلين، رابط -n)؛

1H7(IgG1، قمة لاصقة: الأحماض الأمينية ٩١-٩٩ لـα -سينوكلين)؛ و

١-٢٧ (جسم مضاد عينة مقارنة IgG1 control antibody).

يتلقى الفئران جسم مضاد بجرعة تبلغ١٠ مجم/ جم على مدار ٥ أشهر، لإجمالي ٢١ حقنة. بالإضافة إلى ذلك، تم حقن الحيوانات بالفيروسة البطيئة (LV) التي تعبر وراثياً عن α-سينوكلين بشري (wt) بواسطة الإدخال أحادي الجانب لـα-سينوكلين بشري (wt) داخل الحصين.

تشتمل قراءة الأجسام المضادة على الأجسام المضادة α-سينوكلين من Chemicon (قمة لاصقة: α-سينوكلين تام الطول)، Millipore (قمة لاصقة:α -سينوكلين تام الطول)، و105 ELADW (قمة لاصقة: الأحماض الأمينية ١٢١-١٢٤ لـα -سينوكلين، بشكل مفضل باستخدام α-سينوكلين المبتور عند الوحدة البنائية ١٢٢-١٢٤).

نقاط نهائية: تمت مقارنة معايرات الجسم المضاد قبل إنهاء التجربة. تم تقييم السلوك باستخدام اختبارات متاهة الماء لـ Morris(MWM) و الاختبارات بالأشعة المستديرة الأفقية horizontal round beam tests. تؤدي اختبار الحزمة مستديرة إلى تقييم توازن الحركة round beam test assesses motor balance ، التنسيق، والمشي باستخدام اثنين مجموعتين متغيرة الأقطار. تكون المجموعة A (مجموعة التدريب) كبيرة من حيث القطر، وبالتالي يكون من السهل قطعها. تكون المجموعة D (مجموعة الاختبار) صغيرة من حيث القطر، وبالتالي يصعب قطعها. تم إجراء أداء متاهة الماء في الأسابيع ١٠ وقبل الإنهاء مباشرة. عند انتهاء التجربة، تمت

التضحية بالفئران وتم الحصول على قياسات العصبية neuropathology measurements لتكتل α-سينوكلين، سينباتوفيسين synaptophysin ، و MAP2. بالإضافة إلى ذلك، تم الحصول على قياسات الكيمياء الحيوية biochemistry measurements لـ α-سينوكلين، PSD95، و سينابتوفيسين synaptophysin. تم إجراء الترقيم المتعدد المختار Selected multilabeling والترقيم متحد البؤر confocal labeling باستخدام المرقمات التشابكية synaptic markers ، العصبية neuronal والدبقية glial.

نتائج: تظهر النتائج أن جميع الأجسام المضادة، ما عدا 5D12، وتؤدي إلى وجود كبير في تراكم α-syn والحفاظ معدلات الكثافة التشابكية والتغصنية، وكذلك النواتج الموجبة في أداء اختبارات متاهة الماء MWM. يكون الجسم المضاد 9E4 فعالاً في الدراسات في الكائن الحي والمعمل وكذلك اختبارات سلوكية. على وجه التحديد، تشير النتائج أن الأجسام المضادة α-سينوكلين يمكن أن تقلل نواتج التكتل المتعلقة بالتهاب الأعصاب/α -سينوكلين المحور العصبي.

نتائج سلوكية: تؤدي الأجسام المضادة 5C1 و9E4 إلى تحسين أداء متاهة الماء في فئران متحورة وراثياً بـ α-سينوكلين، مثل 1H7، إلى حد قليل. انظر شكل ٣. على النقيض، لا يعمل الجسم المضاد 5D12 على تحسين أداء المتاهة في الفئران المحورة وراثياً بـ α-سينوكلين. بالنسبة لاختبار المجموعة المستديرة الأفقية، تعمل كلا الأجسام المضادة 9E4 و1H7 على تحسين الأداء كما تم القياس بواسطة كلا سرعة وعدد الأخطاء، بينما لا تعمل الأجسام المضادة 5D12 و5C1 على ذلك. انظر شكل ٤. يتم تقديم البيانات الواردة في شكل ٤ كرقم انزلاق/١٠ سم (على سبيل المثال، " أخطاء") ونسبة المسافة المنتقلة مقسومة على الزمن المأخوذ للانتقال لمسافة (أي، "سرعة،" تم قياسها في وحدات ١٠ سم/ ثانية).

نتائج عصبية: تعمل الأجسام المضادة 9E4،5C1 ، و1H7 على تقليل الضمور المتعلق بالتهاب الأعصاب ELADW-105 الموجب، بينما لا يعمل الجسم المضاد 5D12. في الفئران المحورة وراثياً بـ α-سينوكلين، يؤدي الجسم المضاد 9E4 إلى تقليل منطقة اللبد العصبي neuropil بنسبة ٤٣٪ في القشرة الحديثة neocortex وبنسبة ٤٠٪ في العقد القاعدية، مقارنة بفئران المقارنة (أي، الفئران التي تتلقى ٢٧-١ IgG1 جسم مضاد للمقارنة). يحتفظ الجسم المضاد 9E4 أيضاً بتبقيع سينباتوفيسين و MAP2 في القشرة الحديثة والعقد القاعدية .

مثال ٣: تشكيل متواليات من النطاقات المتغيرة 5C1

تم استخلاص ووتنقيتها من كريات الخلية الهجينة 5C1 باستخدام طقم QIAGEN® OLIGOTEX® Mrna. تم بعد ذلك استنساخ النقية إلى cDNA باستخدام بادئ ضد اتجاه النسخ dT أوليجو وطقم INVITROGEN® SUPERSCRIPT® II. تم تضخيم متواليات الحمض النووي المشفرة المناطق المتغيرة ثقيلة وخفيفة السلسلة 5C1 من cDNA بواسطة تفاعل السلسلة البوليمري PCR، باستخدام بادئات VH متنكسة وبادئات باتجاه النسخ VL وبادئات مضادة لاتجاه النسخ خاصة بالجين (CH/CL). تم تنقية المنتجات تفاعل السلسلة البوليمري PCR، التي تم تصميمها لتشتمل على متوالية الببتيد الإشاري، نطاق متغير، ونطاق ثابت (ما يصل إلى البادئ المضاد لاتجاه النسخ)، بالجل، المستنسخة إلى ناقل محزز أو ناقل T، ثم إدخالها في متواليات. تم استنتاج المتواليات من تحليل في صورة ٣ نسائل مستقلة على الأقل والتي يكون لها إطار قراءة مفتوح بدءاً باستخدام ميثيونين والممتد من خلال المنطقة المتغيرة داخل المنطقة الثابتة .

يكون للحمض النووي المُشفر nucleic acid encoding للمنطقة المتغيرة ذات السلسلة ثقيلة 5C1 تسلسل متوالية رقم: ٥. وتكون متوالية البروتين المناظرة (شكل ١)، التي تتضمن ببتيد إشارة عند المواضع ١-١٩ (تحته خط) كما يلي :

MERHWIFLFLLSVTGGVHSQVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFT
NYWMNWIKARPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTA
YMHLSSLTSEDSAVYFCASGGHLAYWGQGTVVTVSA(متوالية رقم: ٦)

يكون للحمض النووي المُشفر لمنطقة متغيرة خفيفة السلسلة 5C1 تسلسل متوالية رقم: ٧. تكون متوالية البروتين المناظرة corresponding protein sequence (شكل ٢)، والتي تتضمن ببتيد إشارة عند المواضع ١-١٩ (تحته خط) كما يلي :

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHS
KGNTYLHWYLQKPGQSPKLLINRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISG
VEAEDLGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKLEIR(متوالية رقم: ٨)

يتم توضيح متوالية الحمض الأميني لمنطقة متغيرة ثقيلة السلسلة 5C1 ناضجة (متوالية رقم: ٩) في جدول ١ (التالي)، ويتم توضيح متوالية الحمض الأميني المناظرة لمنطقة متغيرة خفيفة السلسلة لـ 5C1 ناضج (متوالية رقم: ٢٤) في جدول ٢ (التالي). يتم استخدام ترقيم Kabat بصورة شاملة.

مثال ٤: التوافق البشري لـ 5C1 فأري

يظهر تحليل (CDRs) لمنطقة 3H6 Vh ٥ الوحدة البنائية تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H1) (متوالية رقم: ١٠)، ١٧ الوحدة البنائية تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-(CDR H2(متوالية رقم: ١١)، و ٦ وحدات بنائية تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (H3-(CDR(متوالية رقم: ١٢). يظهر التحليل المماثل (CDRs) للمنطقة 3H6 Vk ١٦ وحدة بنائية تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (L1-(CDR(متوالية رقم: ٢٥)، ٧ وحدات بنائية تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (L2-(CDR(متوالية رقم: ٢٦)، و٩ وحدات بنائية تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (L3-(CDR(متوالية رقم: ٢٧).

يظهر تحليل الوحدات البنائية عند السطح البيني بين مناطق 5C1 Vk ومناطق VH أن غلب الوحدات البنائية تكون موجودة عامة.

يسمح البحث في قاعدة البيانات لمتواليات البروتين غير المتكررة من NCBI باختيار الإطارات البشرية المناسبة داخلها لترقيع CDRs)) الفارية لـ5C1 . بالنسبة لـ Vk، تم اختيار سلسلة خفيفة كابا بشرية NCBI لها كود وصول CAB51293.1(GI :٥٥٧٨٧٨٦؛ متوالية رقم: ٢٨). بالنسبة لـVh ، يتم اختيار سلسلة ثقيلة Ig بشرية AAY42876.1(GI:٦٦٠٩٦٥٥٧؛ متوالية رقم: ١٣).

يتم توضيح Vh المتوافقة مع البشر التوضيحية و تصميمات Vk، مع الطافرات العكسية على أساس الأطر البشرية التي تم اختيارها، في جدول ١ و جدول٢، على التوالي.

تصميمات Vh المتوافقة مع البشر التوضيحية

تم تصميم ٥ نسخ متوافقة مع البشر مختلفة لمنطقة 5C1 Vh، H1،H2 ، H3، H4، وH5. في اختيار الطافرات العكسية، يتم في النهائية تركيز الوحدات البنائيةH11، H27، H30، H48، H67، H69، H73، H91، وH94. في كل من تصميمات المنطقة Vh المتوافقة مع البشر، تم تطفير الوحدات البنائيةH11، H27، H30، H48، وH73 عكسياً إلى L،Y ،T ،I ، وK، على التوالي، حيث تُشكل الوحدات البنائية جزء من تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (H1-(CDR وفقاً لتعريف Chothia (H27 وH30) أو تكون الوحدات البنائية المناظرة في المتوالية الإطارية البشرية عبارة عن وحدات بنائية قليلة التكرار (V عند موضع M،H11 عند موضع H48، وE عند موضعH73). بالنسبة نسخة H1(متوالية رقم: ١٤)، تم تطعير الوحدات البنائية الإضافية H67 وH69 عكسياً (إلى A وL، على التوالي) للحفاظ على تغليف تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR). في نسخة H2(متوالية رقم: ١٥)، لم يتم إدخال أي من الطافرات العكسية backmutations (أي، تمت إزالة الطافرات العكسية عند المواضع H67 وH69 في نسخة H1). في نسخة H3(متوالية رقم: ١٦)، تم التطفير العكسي للوحدات البنائية الإضافيةH67، H69، H91، وH94 (إلىA ،L ،F ، وS، على التوالي). تكون الطافرات العكسية H67، H69، وH94 بهدف الحفاظ على تغليف تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)، بينما يتم التطفير العكسي لـ H91، الوحدة البنائية للسطح البيني Vh/Vk، لاختبار تأثيرها على السطح البيني. في نسخة H4 (متوالية رقم: ١٧)، يتم التطفير العكسي للوحدات البنائية الإضافية H67، H69، وH94 (إلى L،A ، وS، على التوالي). بالتالي، تختلف نسخة H4 عن H3 حيث يتم إزالة الطافرات العكسية عند H91. في نسخة H5 (متوالية رقم: ١٨)، يتم التطفير العكسي للوحدة البنائية الإضافية H94 (إلى S)، للحفاظ على تغليف تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR).

جدول١: مناطق VH لـ 5C1 متوافق مع البشر

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
				رقم وصول AAY42876.1					
١	١	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٢	٢	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
٣	٣	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٤	٤	Fr1	L	L	L	L	L	L	L
٥	٥	Fr1	Q	V	V	V	V	V	V
٦	٦	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٧	٧	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
٨	٨	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
٩	٩	Fr1	A	A	A	A	A	A	A
١٠	١٠	Fr1	E	E	E	E	E	E	E

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
١١	١١	Fr1	L	V	L	L	L	L	L
١٢	١٢	Fr1	A	K	K	K	K	K	K
١٣	١٣	Fr1	K	K	K	K	K	K	K
١٤	١٤	Fr1	P	P	P	P	P	P	P
١٥	١٥	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
١٦	١٦	Fr1	T	S	S	S	S	S	S
١٧	١٧	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
١٨	١٨	Fr1	V	V	V	V	V	V	V
١٩	١٩	Fr1	Q	K	K	K	K	K	K
٢٠	٢٠	Fr1	M	V	V	V	V	V	V
٢١	٢١	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
٢٢	٢٢	Fr1	C	C	C	C	C	C	C
٢٣	٢٣	Fr1	K	K	K	K	K	K	K

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
٢٤	٢٤	Fr1	A	A	A	A	A	A	A
٢٥	٢٥	Fr1	S	S	S	S	S	S	S
٢٦	٢٦	Fr1	G	G	G	G	G	G	G
٢٧	٢٧	Fr1	Y	G	Y	Y	Y	Y	Y
٢٨	٢٨	Fr1	T	T	T	T	T	T	T
٢٩	٢٩	Fr1	F	F	F	F	F	F	F
٣٠	٣٠	Fr1	T	N	T	T	T	T	T
٣١	٣١	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H1	N	N	N	N	N	N	N

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
٣٢	٣٢	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H1	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
٣٣	٣٣	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H1	W	A	W	W	W	W	W
٣٤	٣٤	تدرج تصنيف	M	I	M	M	M	M	M

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		العتة الإكلينيكي (CDR)-H1							
٣٥	٣٥	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H1	N	N	N	N	N	N	N
٣٥ أ		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	–	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		ي (CDR)-H1							
٣٥ب		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H1	–	–	–	–	–	–	–
٣٦	٣٦	FR2	W	W	W	W	W	W	W
٣٧	٣٧	FR2	I	V	V	V	V	V	V
٣٨	٣٨	FR2	K	R	R	R	R	R	R
٣٩	٣٩	FR2	A	Q	Q	Q	Q	Q	Q

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
٤٠	٤٠	FR2	R	A	A	A	A	A	A
٤١	٤١	FR2	P	P	P	P	P	P	P
٤٢	٤٢	FR2	G	G	G	G	G	G	G
٤٣	٤٣	FR2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٤٤	٤٤	FR2	G	G	G	G	G	G	G
٤٥	٤٥	FR2	L	L	L	L	L	L	L
٤٦	٤٦	FR2	E	E	E	E	E	E	E
٤٧	٤٧	FR2	W	W	W	W	W	W	W
٤٨	٤٨	FR2	I	M	I	I	I	I	I
٤٩	٤٩	FR2	G	G	G	G	G	G	G
٥٠	٥٠	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	A	G	A	A	A	A	A

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		ي (CDR) -H2							
٥١	٥١	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H2	T	I	T	T	T	T	T
٥٢	٥٢	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (	N	I	N	N	N	N	N

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		CDR) -H2							
٥٢أ	٥٣	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H2	P	P	P	P	P	P	P
٥٢ب		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	–	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		H2-							
٥٢ج		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) H2-	–	–	–	–	–	–	–
٥٣	٥٤	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) H2-	N	I	N	N	N	N	N

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
٥٤	٥٥	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H2	N	F	N	N	N	N	N
٥٥	٥٦	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H2	G	G	G	G	G	G	G
٥٦	٥٧	تدرج تصنيف	Y	T	Y	Y	Y	Y	Y

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		العتة الإكلينيكي (CDR) -H2							
٥٧	٥٨	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H2	T	T	T	T	T	T	T
٥٨	٥٩	تدرج تصنيف العتة الإكلينيك	D	T	D	D	D	D	D

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		ي (CDR)-H2							
٥٩	٦٠	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H2	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
٦٠	٦١	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	N	A	N	N	N	N	N

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		CDR) –H2							
٦١	٦٢	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) –H2	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٦٢	٦٣	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	R	K	R	R	R	R	R

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		-H2							
٦٣	٦٤	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H2	F	F	F	F	F	F	F
٦٤	٦٥	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H2	K	Q	K	K	K	K	K

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
٦٥	٦٦	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H2	D	G	D	D	D	D	D
٦٦	٦٧	FR3	K	R	R	R	R	R	R
٦٧	٦٨	FR3	A	V	A	V	A	A	V
٦٨	٦٩	FR3	I	T	T	T	T	T	T
٦٩	٧٠	FR3	L	I	L	I	L	L	I
٧٠	٧١	FR3	T	T	T	T	T	T	T
٧١	٧٢	FR3	A	A	A	A	A	A	A
٧٢	٧٣	FR3	D	D	D	D	D	D	D

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
٧٣	٧٤	FR3	K	E	K	K	K	K	K
٧٤	٧٥	FR3	S	S	S	S	S	S	S
٧٥	٧٦	FR3	S	T	T	T	T	T	T
٧٦	٧٧	FR3	N	N	N	N	N	N	N
٧٧	٧٨	FR3	T	T	T	T	T	T	T
٧٨	٧٩	FR3	A	A	A	A	A	A	A
٧٩	٨٠	FR3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
٨٠	٨١	FR3	M	M	M	M	M	M	M
٨١	٨٢	FR3	H	E	E	E	E	E	E
٨٢	٨٣	FR3	L	L	L	L	L	L	L
٨٢أ	٨٤	FR3	S	S	S	S	S	S	S
٨٢ب	٨٥	FR3	S	S	S	S	S	S	S
٨٢ج	٨٦	FR3	L	L	L	L	L	L	L

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
٨٣	٨٧	FR3	T	R	R	R	R	R	R
٨٤	٨٨	FR3	S	S	S	S	S	S	S
٨٥	٨٩	FR3	E	E	E	E	E	E	E
٨٦	٩٠	FR3	D	D	D	D	D	D	D
٨٧	٩١	FR3	S	T	T	T	T	T	T
٨٨	٩٢	FR3	A	A	A	A	A	A	A
٨٩	٩٣	FR3	V	V	V	V	V	V	V
٩٠	٩٤	FR3	Y	Y	Y	Y	Y	Y	Y
٩١	٩٥	FR3	F	Y	Y	Y	F	Y	Y
٩٢	٩٦	FR3	C	C	C	C	C	C	C
٩٣	٩٧	FR3	A	A	A	A	A	A	A
٩٤	٩٨	FR3	S	R	R	R	S	S	S
٩٥	٩٩	تدرج تصنيف	G	E	G	G	G	G	G

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		العتة الإكلينيكي (CDR) -H3							
٩٦	١٠٠	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H3	G	G	G	G	G	G	G
٩٧	١٠١	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	H	N	H	H	H	H	H

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		ي (CDR-H3)							
٩٨		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-H3)	–	L	–	–	–	–	–
٩٩		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (	–	N	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		CDR) -H3							
١٠٠		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H3	–	W	–	–	–	–	–
١٠٠أ	١٠٢	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	L	L	L	L	L	L	L

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		H3-							
١٠٠ ب		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) H3-	–	–	–	–	–	–	–
١٠٠ ج		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) H3-	–	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
١٠٠د		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H3	–	–	–	–	–	–	–
١٠٠هـ		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)-H3	–	–	–	–	–	–	–
١٠٠و		تدرج تصنيف	–	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		العتة الإكلينيكي (CDR) -H3							
١٠٠از		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H3	–	–	–	–	–	–	–
١٠٠ح		تدرج تصنيف العتة الإكلينيك	–	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		ي (CDR) -H3							
١٠٠ ط		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H3	–	–	–	–	–	–	–
١٠٠ ي		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (	–	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		CDR) -H3							
١٠٠ ك		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) -H3	–	–	–	–	–	–	–
١٠١	١٠٣	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	A	D	A	A	A	A	A

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
		H3-							
١٠٢	١٠٤	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) H3-	Y	P	Y	Y	Y	Y	Y
١٠٣	١٠٥	FR4	W	W	W	W	W	W	W
١٠٤	١٠٦	FR4	G	G	G	G	G	G	G
١٠٥	١٠٧	FR4	Q	Q	Q	Q	Q	Q	Q
١٠٦	١٠٨	FR4	G	G	G	G	G	G	G

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 فأري (متوالية رقم: ٩)	Hu VH مستقبل FR (متوالية رقم: ١٣)	5C1 H1 (متوالية رقم: ١٤)	5C1 H2 (متوالية رقم: ١٥)	5C1 H3 (متوالية رقم: ١٦)	5C1 H4 (متوالية رقم: ١٧)	5C1 H5 (متوالية رقم: ١٨)
١٠٧	١٠٩	FR4	T	T	T	T	T	T	T
١٠٨	١١٠	FR4	V	L	L	L	L	L	L
١٠٩	١١١	FR4	V	V	V	V	V	V	V
١١٠	١١٢	FR4	T	T	T	T	T	T	T
١١١	١١٣	FR4	V	V	V	V	V	V	V
١١٢	١١٤	FR4	S	S	S	S	S	S	S
١١٣	١١٥	FR4	A	S	S	S	S	S	S

يتم توفير متوالية حمض نووي توضيحية المُشفرة exemplary nucleic acid sequences encoding لـ 5C1 H1، H2 ، H3، H4، و H5 متوافقة مع البشر في متواليات أرقام :١٩، ٢٠، ٢١، ٢٢، و٢٣، على التوالي.

تصميمات Vk متوافقة مع البشر توضيحية

تسمى ٤ نسخ متوافقة مع البشر مختلفة لمنطقة 5C1 Vk، L1، L2، L3، وL4. في ختيار الطافرات العكسية، يتم في النهاية تركيز الوحدات البنائيةL2، L12، L14، L45،L49 ، وL87. في كل من تصميمات المنطقة Vk المتوافقة مع البشر، يتم التطفير العكسي للوحدات البنائية L12 وL14 إلى S حيث تكون الوحدات البنائية المناظرة في المتوالية الإطارية البشرية human framework sequence (P وT، على التوالي) عبارة عن وحدات بنائية منخفضة التكرار. بالنسبة للنسخة L1 (متوالية رقم: ٢٩)، يتم التطفير العكسي للوحدات البنائية الإضافية L2، L45، L49، وL87 (إلى K،V ، N، وF، على التوالي). تكون L2 عبارة عن وحدة بنائية معيارية /تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR) وحدة بنائية تفاعلية؛ تخضع L45 لتحويل قطبية/ شحنة من متواليات إطار فأري إلى بشري (K إلى Q)، بالتالي يمكن أن تؤثر على الطي؛ ويكون L49 عبارة عن وحدة بنائية Vernier؛ وتكون L87 عبارة عن وحدة بنائية بينية Vh/Vk. في نسخة L2 (متوالية رقم: ٣٠)، تم التطفير العكسي للوحدة البنائية L45 إلى K. بالتالي، بالنسبة لـ L1، تتم إزالة الطافرات العكسية عند الوحدات البنائية L2،L49 ، وL87. في نسخة L3(متوالية رقم: ٣١)، تم التطفير العكسي للوحدات البنائية الإضافية L2،L49 ، وL87 (لـV ،N ، وF، على التوالي). بالتالي، بالنسبة لـL1 ، تمت إزالة التطفير العكسي عند الوحدة البنائية L45. في نسخة L4(متوالية رقم: ٣٢)، لم يتم التطفير العكسي للوحدات (أي، التطفير العكسي للوحدات البنائيةL12 وL14 فقط).

جدول٢: مناطق 5C1 Vk متوافقة مع البشر

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1)L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1)L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1)L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1)L4 متوالية رقم: ٣٢)
				رقم وصول CAB51293.1				
١	١	Fr1	D	D	D	D	D	D
٢	٢	Fr1	V	I	V	I	V	I
٣	٣	Fr1	V	V	V	V	V	V
٤	٤	Fr1	M	M	M	M	M	M
٥	٥	Fr1	T	T	T	T	T	T
٦	٦	Fr1	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٧	٧	Fr1	I	S	S	S	S	S
٨	٨	Fr1	P	P	P	P	P	P
٩	٩	Fr1	L	L	L	L	L	L
١٠	١٠	Fr1	Y	S	S	S	S	S
١١	١١	Fr1	L	L	L	L	L	L
١٢	١٢	Fr1	S	P	S	S	S	S

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
١٣	١٣	Fr1	V	V	V	V	V	V
١٤	١٤	Fr1	S	T	S	S	S	S
١٥	١٥	Fr1	P	P	P	P	P	P
١٦	١٦	Fr1	G	G	G	G	G	G
١٧	١٧	Fr1	D	E	E	E	E	E
١٨	١٨	Fr1	Q	P	P	P	P	P
١٩	١٩	Fr1	A	A	A	A	A	A
٢٠	٢٠	Fr1	S	S	S	S	S	S
٢١	٢١	Fr1	I	I	I	I	I	I
٢٢	٢٢	Fr1	S	S	S	S	S	S
٢٣	٢٣	Fr1	C	C	C	C	C	C
٢٤	٢٤	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	R	R	R	R	R	R

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		(-CDR) L1						
٢٥	٢٥	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	S	S	S	S	S	S
٢٦	٢٦	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	S	S	S	S	S	S
٢٧	٢٧	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	Q	Q	Q	Q	Q	Q

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		(-CDR) L1						
٢٧أ	٢٨	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	S	S	S	S	S	S
٢٧ب	٢٩	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	L	L	L	L	L	L
٢٧ج	٣٠	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	F	L	F	F	F	F

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		(-CDR) L1						
٢٧د	٣١	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	H	H	H	H	H	H
٢٧هـ	٣٢	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	S	S	S	S	S	S
٢٧و		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		(-CDR) L1						
٢٨	٣٣	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	K	N	K	K	K	K
٢٩	٣٤	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	G	G	G	G	G	G
٣٠	٣٥	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	N	Y	N	N	N	N

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		(-CDR) L1						
٣١	٣٦	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	T	N	T	T	T	T
٣٢	٣٧	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	Y	Y	Y	Y	Y	Y
٣٣	٣٨	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي	L	L	L	L	L	L

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: (٢٤	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: (٢٨	5C1)L1(متوالية رقم:٢٩)	5C1)L2(متوالية رقم: (٣٠	5C1)L3(متوالية رقم: (٣١	5C1)L4(متوالية رقم: (٣٢
		(-CDR) L1						
٣٤	٣٩	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L1	H	D	H	H	H	H
٣٥	٤٠	FR2	W	W	W	W	W	W
٣٦	٤١	FR2	Y	Y	Y	Y	Y	Y
٣٧	٤٢	FR2	L	L	L	L	L	L
٣٨	٤٣	FR2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٣٩	٤٤	FR2	K	K	K	K	K	K
٤٠	٤٥	FR2	P	P	P	P	P	P
٤١	٤٦	FR2	G	G	G	G	G	G

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
٤٢	٤٧	FR2	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٤٣	٤٨	FR2	S	S	S	S	S	S
٤٤	٤٩	FR2	P	P	P	P	P	P
٤٥	٥٠	FR2	K	Q	K	K	Q	Q
٤٦	٥١	FR2	L	L	L	L	L	L
٤٧	٥٢	FR2	L	L	L	L	L	L
٤٨	٥٣	FR2	I	I	I	I	I	I
٤٩	٥٤	FR2	N	Y	N	Y	N	Y
٥٠	٥٥	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-L2)	R	L	R	R	R	R
٥١	٥٦	تدرج تصنيف	V	G	V	V	V	V

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1)L1(متوالية رقم: ٢٩)	5C1)L2(متوالية رقم: ٣٠)	5C1)L3(متوالية رقم: ٣١)	5C1)L4(متوالية رقم: ٣٢)
		العتة الإكلينيكي (CDR-)٢L						
٥٢	٥٧	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-)٢L	S	S	S	S	S	S
٥٣	٥٨	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-)٢L	N	N	N	N	N	N
٥٤	٥٩	تدرج تصنيف	R	R	R	R	R	R

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		العتة الإكلينيكي (CDR-) ٢L						
٥٥	٦٠	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-) ٢L	F	A	F	F	F	F
٥٦	٦١	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-) ٢L	S	S	S	S	S	S
٥٧	٦٢	FR3	G	G	G	G	G	G

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم:٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
٥٨	٦٣	FR3	V	V	V	V	V	V
٥٩	٦٤	FR3	P	P	P	P	P	P
٦٠	٦٥	FR3	D	D	D	D	D	D
٦١	٦٦	FR3	R	R	R	R	R	R
٦٢	٦٧	FR3	F	F	F	F	F	F
٦٣	٦٨	FR3	S	S	S	S	S	S
٦٤	٦٩	FR3	G	G	G	G	G	G
٦٥	٧٠	FR3	S	S	S	S	S	S
٦٦	٧١	FR3	G	G	G	G	G	G
٦٧	٧٢	FR3	S	S	S	S	S	S
٦٨	٧٣	FR3	G	G	G	G	G	G
٦٩	٧٤	FR3	T	T	T	T	T	T
٧٠	٧٥	FR3	D	D	D	D	D	D
٧١	٧٦	FR3	F	F	F	F	F	F

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم:٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
٧٢	٧٧	FR3	T	T	T	T	T	T
٧٣	٧٨	FR3	L	L	L	L	L	L
٧٤	٧٩	FR3	K	K	K	K	K	K
٧٥	٨٠	FR3	I	I	I	I	I	I
٧٦	٨١	FR3	S	S	S	S	S	S
٧٧	٨٢	FR3	G	R	R	R	R	R
٧٨	٨٣	FR3	V	V	V	V	V	V
٧٩	٨٤	FR3	E	E	E	E	E	E
٨٠	٨٥	FR3	A	A	A	A	A	A
٨١	٨٦	FR3	E	E	E	E	E	E
٨٢	٨٧	FR3	D	D	D	D	D	D
٨٣	٨٨	FR3	L	V	V	V	V	V
٨٤	٨٩	FR3	G	G	G	G	G	G
٨٥	٩٠	FR3	V	V	V	V	V	V

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
٨٦	٩١	FR3	Y	Y	Y	Y	Y	Y
٨٧	٩٢	FR3	F	Y	F	Y	F	Y
٨٨	٩٣	FR3	C	C	C	C	C	C
٨٩	٩٤	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L3	S	M	S	S	S	S
٩٠	٩٥	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L3	Q	Q	Q	Q	Q	Q
٩١	٩٦	تدرج تصنيف	S	A	S	S	S	S

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		العتة الإكلينيكي (-CDR) L3						
٩٢	٩٧	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L3	A	L	A	A	A	A
٩٣	٩٨	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L3	H	Q	H	H	H	H
٩٤	٩٩	تدرج تصنيف	V	T	V	V	V	V

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		العتة الإكلينيكي (CDR-) L3						
٩٥	١٠٠	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-) L3	P	P	P	P	P	P
A٩٥		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-) L3	–	–	–	–	–	–
B٩٥		تدرج تصنيف	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1 (L1 متوالية رقم: ٢٩)	5C1 (L2 متوالية رقم: ٣٠)	5C1 (L3 متوالية رقم: ٣١)	5C1 (L4 متوالية رقم: ٣٢)
		العتة الإكلينيكي (CDR-) L3						
C٩٥		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-) L3	–	–	–	–	–	–
D٩٥		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR-) L3	–	–	–	–	–	–
E٩٥		تدرج تصنيف	–	–	–	–	–	–

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1)L1(متوالية رقم: ٢٩)	5C1)L2(متوالية رقم: ٣٠)	5C1)L3(متوالية رقم: ٣١)	5C1)L4(متوالية رقم: ٣٢)
		العتة الإكلينيكي (-CDR) L3						
F٩٥		تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L3	–	–	–	–	–	–
٩٦	١٠١	تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (-CDR) L3	W	P	W	W	W	W
٩٧	١٠٢	تدرج تصنيف	T	T	T	T	T	T

رقم كابات	رقم خطي	FR أو تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)	5C1 VL فأري (متوالية رقم: ٢٤)	Hu Vk مستقبل Fr(متوالية رقم: ٢٨)	5C1)L1(متوالية رقم:٢٩)	5C1)L2(متوالية رقم: ٣٠)	5C1)L3(متوالية رقم: ٣١)	5C1)L4(متوالية رقم: ٣٢)
		العتة الإكلينيكي (-CDR) L3						
٩٨	١٠٣	FR4	F	F	F	F	F	F
٩٩	١٠٤	FR4	G	G	G	G	G	G
١٠٠	١٠٥	FR4	G	G	G	G	G	G
١٠١	١٠٦	FR4	G	G	G	G	G	G
١٠٢	١٠٧	FR4	T	T	T	T	T	T
١٠٣	١٠٨	FR4	K	K	K	K	K	K
١٠٤	١٠٩	FR4	L	V	V	V	V	V
١٠٥	١١٠	FR4	E	E	E	E	E	E
١٠٦	١١١	FR4	I	I	I	I	I	I
A١٠٦		FR4	–	–	–	–	–	–
١٠٧	١١٢	FR4	R	K	K	K	K	K

يتم توفير متواليات حمض نووي تمثيلية مُشفرة لـ 5C1 L1، L2، L3، و L4 في متواليات رقم: ٣٣، ٣٤، ٣٥، و٣٦، على التوالي.

مثال ٥: ألفة أجسام 5C1 مضادة بشرية لألفا-سينوكلين

تم تحليل ألفة توليفات مختلفة من بروتينات 5C1 سلسلة ثقيلة متوافقة مع البشر وسلسلة خفيفة متوافقة مع البشر لـ α-سينوكلين بواسطة اختبار فحص الأنزيم المرتبط مناعياً ELISA. كما هو موضح في شكل ٥، لم تظهر نسخة H1L1 لجسم مضاد 5C1 متوافق مع البشر ألفة تجاه α-سينوكلين في ظل ظروف الاختبار. على العكس، يكون لجسم 5C1 مضاد خيمري ألفة مرتفعة تجاه α-سينوكلين مقارنةً بجسم 5C1 مضاد لقارض. تعمل نسخ H3L4، H4L3 متوافقة مع البشر، و H + L3 خيمرية بشكل مماثل، وكذلك الجسم 5C1 المضاد الخيمري. بالإضافة إلى ذلك، تعمل نسخ H3L3 و H3L1 بشكل مماثل، إلا أنها تعمل بألفة منخفضة بعض الشيء مقارنةً بـ H3L4، H4L3، و H + L3 خيمرية.

كما تم تحليل نسخ مختلفة جسم 5C1 مضاد متوافق مع البشر بواسطة Biacore، ليتم بدقة أكبر تحديد قيم ألفة الارتباط. تم تحضير رقاقة CM5 Biacore لمضاد IgG بشري باتباع بروتوكول تم الحصول عليه من GE Healthcare. لتم احتجاز كل نسخة جسم 5C1 مضاد متوافق مع البشر على حدة عند مستوى لا تتجاوز فيه Rmax قيمة ٥٠، باستخدام المعادلة:

Rmax = (RU لجسم مضاد محتجز) * (MW للسينوكلين)/(MW لجسم مضاد محتجز) * ٢

يكون عامل ٢ في لامقام لعدد مواضع الارتباط على الجسم المضاد. يتم تدفق ألفا سينوكلين على وحدة قطع بتركيز يتراوح من ~١٠مرات أعلى من KD المتوقع إلى ~١٠ مرات أقل من KD المتوقع. تم تجميع البيانات وطرح المرجع المزدوج لحساب الإزاحة والكميات الصغيرة من للارتباط غير النوعي. تم تحليل البيانات باستخدام برنامج تقييم BIAcore باستخدام نموذج ١: ١ ومنحنى شامل.

تم تلخيص نتائج تحليل Biacore في جدول ٣ (أدناه). تدل البيانات على أن غالبية الفقد في الألفة تجاه ألفا سينوكلين ترجع إلى زيادة معدل الاستبعاد في بعض نسخ الجسم المضاد. على أساس بيانات الألفة، تم تحديد أن H4L3 هو الجسم المضاد المفضل.

جدول ٣: قيم ألفة محددة بواسطة Biacore لصورة أجسام 5C1 مضادة متغيرة

صورة 5C1 متغيرة	رقم إطار AAs فأري		KD	Kon	Koff
	HC	LC			
m5C1	٨٢	٨٠	٦٨,٧ نانو مولار	٧,٥ × ١٠٤/ثانية	٥,١ × ١٠٣/ثانية
Ch5C1	٨٢	٨٠	٨٦,٠ نانو مولار	٦,١ × ١٠٤/ثانية	٥,٣ × ١٠٣/ثانية
h5C1_H3L4	٦٥، تشتمل على ٩ طفرات عكسية (V11L, G27Y, N30T, M48I, V67A, I69L, E73K, Y91F, R94S)	٦٩، تشتمل على ٢ طفرات عكسية (P12S، T14S)	١٢٣٧,٠ نانو مولار	٤,٤ × ١٠٤/ثانية	٥٤,٥ × ١٠٣/ثانية
h5C1_H4L3	٦٤، تشتمل على ٨	٧٢، تشتمل	١١٩,٨ نانو مولار	٤,٤ × ١٠٤/ثانية	٥,١ × ١٠٣/ثانية

	طفرات عكسية (V11L، G27Y، N30T، M48I، V67A، I69L، E73K، R94S)	على ٥ طفرات عكسية (I2V، P12S، T14S، Y49N، Y87F)			
h5C1_H4L4		٦٠٠,٩ نانو مولار	٥,٣ × ١٠٤/ثانية	٣٢,٤ × ١٠٣/ثانية	٦٩، تشتمل على ٢ طفرات عكسية (P12S، T14S)
h5C1_H5L3	٦٢، تشتمل على ٦ طفرات عكسية (V11L، G27Y، N30T، M48I، E73K، R94S)	٧٢، تشتمل على ٥ طفرات عكسية (I2V، P12S، T14S، Y49N، Y87F)	٢٨٣,١ نانو مولار	٣,٩ × ١٠٤/ثانية	١١,١ × ١٠٣/ثانية

h5C1_H5L4		٦٩، تشتمل على ٢ طفرات عكسية (P12S، T14S)	١٠٦٢,٠ نانو مولار	٣,٧ × ١٠٤/ثانية	٤٠,٣ × ١٠٣/ثانية

مثال ٦: فحص التطفير بالألانين

ترتبط القمم اللاصقة بواسطة الأجسام المضادة 9E4،5C1 وتم تقريباً تحديد أن 5D12 موجود في الوحدات البنائية ١١٨-١٢٦ لألفا سينوكلين بسبب الأجسام المضادة المرتبطة ببتيدات متراكبة. يصف هذا المثال تعيين أكثر دقة، بواسطة فحص التطفير بالألانين، لكل وحدة بنائية بين المواضع ١١٨ و١٢٦ لألفا سينوكلين. يتم استخدام الألانين بسبب مجموعة الميثيل الخاصة به غير الكتلية، الخاملة كيميائياً، التي تحاكي أفضليات البنية الثانوية التي تشتمل عليها الأحماض الأمينية الأخرى. توضح الأجزاء العلوية للأشكال ٦، ٧ و٨ نتائج بقع ويسترن المبقعة باستخدام الأجسام المضادة 9E4،5C1 و5D12، على التوالي. تشتمل البقع على ألفا سينوكلين تام الطول وطفرات ألفا سينوكلين إلى نقطة معينة يتم إنتاها بواسطة فحص التطفير بالألانين للوحدات البنائية ١١٨-١٢٦ وكانت مبقعة باستخدام ٠,٥ ميكرو جرام/مللي لتر من الجسم المضاد. تعمل الطفرات عند المواضع ١٢٢ و١٢٥ بشكل أساسي إلغاء ارتباط 9E4، حيث يكون للطفرات في المواضع الأخرى تأثير بسيط. بالتالي، يتلامس 9E4 بشكل سائد مع الوحدات البنائية ١٢٢ و١٢٥. ١٢٠-١٢٢ بشكل أساسي على إلغاء ارتباط 5C1، وتعمل الطفرات عند المواضع ١٢٣ و١٢٤ بدرجة كبيرة على تقليل الارتباط وليس إلغائه. بالتالي، يتلامس 5C1 بشكل سائد مع الوحدات البنائية١٢٠-١٢٢ و، إلى حد ما، الوحدات البنائية ١٢٣-١٢٤. تعمل الطفرات عند المواضع ١٢٠-١٢٢ بشكل أساسي على إلغاء ارتباط 5D12، وتعمل الطفرات عند المواضع ١١٨، ١١٩، ١٢٣ و١٢٤ إلى حدٍ كبير على تقليل الارتباط وليس إلغائه. بالتالي، يرتبط 5D12 بشكل سائد بالمواضع ١٢٠-١٢٢، وإلى حدٍ ما، المواضع ١١٨، ١١٩، ١٢٣، و١٢٤. في كل من الأشكال

٦-٨، يتم استخدام جسم 1H7 مضاد كعينة مقارنة. يرتبط 1H7 بالوحدات البنائية٩١-٩٨ لألفا سينوكلين، وبالتالي يتوقع ارتباطه بألفا سينوكلين بغض النظر عن وجود الطفرات في الوحدات البنائية ١١٨-١٢٦.

يمكن أن تعكس قيم نوعيى ارتباط 9E4 المختلفة مقارنةً بـ 5C1 و5D12 جزئياً طرق الإنتاج ذات الصلة الخاصة بها. تم تحضير 9E4 بواسطة التحصين باستخدام ألفا سينوكلين تام الطول التي تؤدي إلى قيام جسم مضاد بربط قمة لاصقة متوافقة. تم تحضير 5C1 و5D12 بواسطة تحصين باستخدام ببتيد من ١٠ أحماض أمينية التي تؤدي إلى قمة لاصقة خطية.

شكل ٩ عبارة عن نموذج كرة وعصا للأحماض الأمينية في ألفا سينوكلين قريب من مواضع ارتباط الأجسام المضادة 5C1،9E4 و5D12. تكون اثنين من الوحدات البنائية غير المستمرة للقمة اللاصقة المرتبطة بواسطة 9E4، الوحدات البنائية ١٢٢ و١٢٥، جيب في توافق بروتين ألفا سينوكلين تام الطول.

يمكن إدخال العديد التغييرات والتعديلات على الاختراع بدون الابتعاد فجوى ومجال عناصر الحماية المرفقة. ما لم يتضح خلاف ذلك بوضوح من السياق، يمكن استخدام أي خطوة، سمة، نموذج، أو جانب في توليفة مع بعضها البعض. تم تضمين جميع النشرات، إيداعات براءة الاختراع، المواقع الألكترونية، أرقام الوصول وما هو مذكورة في هذا الوصف كمرجع في مجمله كما لو أنه تمت الإشارة إلى تضمين كل نشرة أو طلب براءة اختراع على حدة بشكل خاص وبشكل مستقل كمرجع. عند الإشارة إلى النسخ المختلفة للمراجع، فإن ذلك يعني النسخة الأحدث في تاريخ الإيداع الفعلي للطلب.

الوصف المختصر للمتواليات

متوالية رقم :١ عبارة عن α-سينوكلين بشري من النمط البري.

متوالية رقم :٢ عبارة عن نطاق مكون غير نشواني (NAC) لـ α-سينوكلين، كما تم التوضيح بواسطة Jensen et al. (1995).

متوالية رقم :٣ عبارة عن نطاق مكون غير نشواني (NAC) لـ α-سينوكلين، كما تم التوضيح بواسطة Uéda et al. (1993).

متوالية رقم :٤ عبارة عن وحدات بنائية لحمض أميني لجين مناعي ببتيد 5C1 ١١٨٥-١٢٩ لـ α-سينوكلين بشري.

VDPDNEAYEGGC

متوالية رقم :٥ عبارة عن متوالية نيوكليوتيد تُشفر منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة 5C1فأري مع ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

atggaaaggcactggatctttctcttcctgttatcagtaactggaggtgtccactcccaggtccagctgcag
cagtctggggctgaactggcaaaacctgggacctcagtgcagatgtcctgcaaggcttctggctacacct
ttactaattactggatgaactggataaaagcgaggcctggacagggtctggaatggattggggctactaa
tcctaacaatggttatactgactacaatcagaggttcaaggacaaggccatattaactgcagacaaatcc
tccaatacagcctacatgcacctgagcagcctgacatctgaagactctgcagtctatttctgtgcaagtgg
ggggcacttggcttactggggccaggggactgtggtcactgtctctgca

متوالية رقم :٦ عبارة عن منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة لـ5C1 فأري مع ببتيد إشاري (تحته خط).

MERHWIFLFLLSVTGGVHSQVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFT
NYWMNWIKARPGQGLEWIGATNPNNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTA
YMHLSSLTSEDSAVYFCASGGHLAYWGQGTVVTVSA

متوالية رقم :٧ عبارة عن متوالية نيوكليوتيد تُشفر منطقة متغيرة خفيفة السلسلة لـ 5C1 فأري مع ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

atgaagttgcctgttaggctgttggtgctgatgttctggattcctgcttccagcagtgatgttgtgatgacccaa
attccactctacctgtctgtcagtcctggagatcaagcctccatctcttgcagatctagtcagagccttttccat
agtaaaggaaacacctatttacattggtatctgcagaagccaggccagtctccaaagctcctgatcaaca
gggtttccaaccgattttctggggtcccagacaggttcagtggcagtggatcagggacagatttcacactc

aagatcagcggagtggaggctgaagatctgggagtttatttctgttctcaaagtgcacatgttccgtggac
gttcggtggaggcaccaagctggaaatcaga

متوالية رقم :٨ عبارة عن متوالية منطقة متغيرة خفيفة السلسلة لـ 5C1 فأري مع ببتيد إشاري (تحته خط)

MKLPVRLLVLMFWIPASSSDVVMTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHS
KGNTYLHWYLQKPGQSPKLLINRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISG
VEAEDLGVYFCSQSAHVPWTFGGGTKLEIR

متوالية رقم :٩ عبارة عن منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة ناضجة لـ 5C1 فأري مع (CDRs) تحته خط. تكون (CDRs) التي يوجد تحتها خط كما تم التحديد بواسطة Kabat باستثناء تكون تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)H1 التي يوجد تحتها خط عبارة عن مركب من تعريفات Kabat و Chothia.

QVQLQQSGAELAKPGTSVQMSCKASGYTFTNYWMNWIKARPGQGLEWI
GATNPNNGYTDYNQRFKDKAILTADKSSNTAYMHLSSLTSEDSAVYFCAS
GGHLAYWGQGTVVTVSA

متوالية رقم :١٠ عبارة عن متوالية سلسلى ثقيلة تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)1 لـ 5C1.

NYWMN

متوالية رقم :١١ عبارة عن متوالية سلسلة ثقيلة تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)2 لـ 5C1.

ATNPNNGYTDYNQRFKD

متوالية رقم :١٢ عبارة عن متوالية سلسلة ثقيلة تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)3 لـ 5C1 .

GGHLAY

متوالية رقم :١٣ عبارة عن FR مستقبل VH بشري (رقم وصول AAY42876.1).

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGGTFNNYAINWVRQAPGQGLEWM
GGIIPIFGTTTYAQKFQGRVTITADESTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAREG
NLNWLDPWGQGTLVTVSS

متوالية رقم : ١٤ عبارة عن متوالية 5C1H1 متوافقة مع البشر.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWI
GATNPNNGYTDYNQRFKDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCA
RGGHLAYWGQGTLVTVSS

متوالية رقم :١٥ عبارة عن متوالية 5C1H2متوافقة مع البشر.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWI
GATNPNNGYTDYNQRFKDRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR
GGHLAYWGQGTLVTVSS

متوالية رقم :١٦ عبارة عن متوالية5C1H3 متوافقة مع البشر.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWI
GATNPNNGYTDYNQRFKDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYFCAS
GGHLAYWGQGTLVTVSS

متوالية رقم :١٧ عبارة عن متوالية5C1H4 متوافقة مع البشر.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWI
GATNPNNGYTDYNQRFKDRATLTADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCA
SGGHLAYWGQGTLVTVSS

متوالية رقم :١٨ عبارة عن متوالية 5C1H5 متوافقة مع البشر.

QVQLVQSGAELKKPGSSVKVSCKASGYTFTNYWMNWVRQAPGQGLEWI

GATNPNNGYTDYNQRFKDRVTITADKSTNTAYMELSSLRSEDTAVYYCAS

GGHLAYWGQGTLVTVSS

متوالية رقم :١٩ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر 5C1H1 متوافق مع البشر مع ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCTGGTGGCCATCCTGAAGGG

CGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAG

AAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACAC

CTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG

GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGAC

TACAACCAGCGCTTCAAGGACCGCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTC

CACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTCCGAGGACA

CCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGG

CCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCC

متوالية رقم :٢٠ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر 5C1H2 متوافقة مع البشري باستخدام ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCTGGTGGCCATCCTGAAGGG

CGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAG

AAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACAC

CTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG

GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGAC

TACAACCAGCGCTTCAAGGACCGCGTGACCATCACCGCCGACAAGTC

CACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTCCGAGGACA

CCGCCGTGTACTACTGCGCCCGCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGG
CCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCC

متوالية رقم :٢١ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر 5C1H3 متوافق مع البشر باستخدام ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCTGGTGGCCATCCTGAAGGG
CGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAG
AAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACAC
CTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGAC
TACAACCAGCGCTTCAAGGACCGCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTC
CACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTCCGAGGACA
CCGCCGTGTACTTCTGCGCCTCCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGC
CAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCC

متوالية رقم :٢٢ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر5C1H4 متوافق مع البشر باستخدام ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCTGGTGGCCATCCTGAAGGG
CGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAG
AAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACAC
CTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGAC
TACAACCAGCGCTTCAAGGACCGCGCCACCCTGACCGCCGACAAGTC
CACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTCCGAGGACA
CCGCCGTGTACTACTGCGCCTCCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGGC
CAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCC

متوالية رقم :٢٣ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر 5C1H5 متوافق مع البشر باستخدام ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGAGTTCGGCCTGTCCTGGCTGTTCCTGGTGGCCATCCTGAAGGG
CGTGCAGTGCCAGGTGCAGCTGGTGCAGTCCGGCGCCGAGCTGAAG
AAGCCCGGCTCCTCCGTGAAGGTGTCCTGCAAGGCCTCCGGCTACAC
CTTCACCAACTACTGGATGAACTGGGTGCGCCAGGCCCCCGGCCAGG
GCCTGGAGTGGATCGGCGCCACCAACCCCAACAACGGCTACACCGAC
TACAACCAGCGCTTCAAGGACCGCGTGACCATCACCGCCGACAAGTC
CACCAACACCGCCTACATGGAGCTGTCCTCCCTGCGCTCCGAGGACA
CCGCCGTGTACTACTGCGCCAGCGGCGGCCACCTGGCCTACTGGGG
CCAGGGCACCCTGGTGACCGTGTCCTCC

متوالية رقم :٢٤ عبارة عن متوالية منطقة متغيرة خفيفة السلسلة ناضجة 5C1فأرية بها (CDRs) تحته خط. يكون (CDRs) الذي يتم وضع خط أسفله كما تم التحديد بواسطة Kabat.

DVVMTQIPLYLSVSPGDQASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPK
LLINRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISGVEAEDLGVYFCSQSAHVP
WTFGGGTKLEIR

متوالية رقم :٢٥ عبارة عن متوالية سلسلة خفيفة تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)1 لـ 5C1.

RSSQSLFHSKGNTYLH

متوالية رقم :٢٦ عبارة عن متوالية سلسلة خفيفة تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR)2 لـ5C1.

RVSNRFS

متوالية رقم :٢٧ عبارة عن متوالية سلسلة خفيفة تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR(3 لـ 5C1.

SQSAHVPWT

متوالية رقم :٢٨ عبارة عن FR مستقبل VL بشري (رقم وصول CAB51293.1).

DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISCRSSQSLLHSNGYNYLDWYLQKPGQSPQ
LLIYLGSNRASGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCMQALQTP
PTFGGGTKVEIK

متوالية رقم :٢٩ عبارة عن متوالية 5C1L1 متوافقة مع البشر.

DVVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSP
KLLINRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHV
PWTFGGGTKVEIK

متوالية رقم :٣٠ عبارة عن متوالية 5C1L2 متوافقة مع البشر.

DIVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPK
LLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVP
WTFGGGTKVEIK

متوالية رقم :٣١ عبارة عن متوالية 5C1L3 متوافقة مع البشر.

DVVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSP
QLLINRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHV
PWTFGGGTKVEIK

متوالية رقم :٣٢ عبارة عن متوالية 5C1L4 متوافقة مع البشر.

DIVMTQSPLSLSVSPGEPASISCRSSQSLFHSKGNTYLHWYLQKPGQSPQ
LLIYRVSNRFSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYFCSQSAHVP
WTFGGGTKVEIK

متوالية رقم :٣٣ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر 5C1L1 متوافق مع البشر باستخدم ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTG
GGTGTCCGGCTCCTCCGGCGACGTGGTGATGACCCAGTCCCCCCTGT
CCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCTCCATCTCCTGCCGCTCC
TCCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTAC
CTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCAACCGCGTGTC
CAACCGCTTCTCCGGCGTGCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCG
GCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTG
GGCGTGTACTTCTGCTCCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGG
CGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

متوالية رقم :٣٤ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر 5C1L2 متوافقة مع البشر باستخدام ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTG
GGTGTCCGGCTCCTCCGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGT
CCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCTCCATCTCCTGCCGCTCC
TCCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTAC
CTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCAAGCTGCTGATCTACCGCGTGTC
CAACCGCTTCTCCGGCGTGCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCG
GCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTG

GGCGTGTACTACTGCTCCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGG

CGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

متوالية رقم :٣٥ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر 5C1L3 متوافق مع البشر باستخدام ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTG

GGTGTCCGGCTCCTCCGGCGACGTGGTGATGACCCAGTCCCCCCTGT

CCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCTCCATCTCCTGCCGCTCC

TCCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTAC

CTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCCAGCTGCTGATCAACCGCGTGTC

CAACCGCTTCTCCGGCGTGCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCG

GCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTG

GGCGTGTACTTCTGCTCCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGG

CGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

متوالية رقم :٣٦ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر 5C1L4 متوافق مع البشر باستخدام ببتيد إشارة مُشفر للمتوالية (تحته خط).

ATGGACATGCGCGTGCCCGCCCAGCTGCTGGGCCTGCTGATGCTGTG

GGTGTCCGGCTCCTCCGGCGACATCGTGATGACCCAGTCCCCCCTGT

CCCTGTCCGTGTCCCCCGGCGAGCCCGCCTCCATCTCCTGCCGCTCC

TCCCAGTCCCTGTTCCACTCCAAGGGCAACACCTACCTGCACTGGTAC

CTGCAGAAGCCCGGCCAGTCCCCCCAGCTGCTGATCTACCGCGTGTC

CAACCGCTTCTCCGGCGTGCCCGACCGCTTCTCCGGCTCCGGCTCCG

GCACCGACTTCACCCTGAAGATCTCCCGCGTGGAGGCCGAGGACGTG

GGCGTGTACTACTGCTCCCAGTCCGCCCACGTGCCCTGGACCTTCGG

CGGCGGCACCAAGGTGGAGATCAAG

متوالية رقم :٣٧ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر منطقة ثابتة IgG1 توضحية بشرية.

gcctccaccaagggcccatcggtcttccccctggcaccctcctccaagagcacctctgggggcacagc
ggccctgggctgcctggtcaaggactacttccccgaaccggtgacggtgtcgtggaactcaggcgccct
gaccagcggcgtgcacaccttcccggctgtcctacagtcctcaggactctactccctcagcagcgtggtg
accgtgccctccagcagcttgggcacccagaccacatctgcaacgtgaatcacaagcccagcaacac
caaggtggacaagagagttgagcccaaatcttgtgacaaaactcacacatgcccaccgtgcccagca
cctgaactcctgggggggaccgtcagtcttcctcttcccccaaaacccaaggacaccctcatgatctccc
ggacccctgaggtcacatgcgtggtggtggacgtgagccacgaagaccctgaggtcaagttcaactgg
tacgtggacggcgtggaggtgcataatgtcaagacaaagccgcgggaggagcagtacaacagcacg
taccgtgtggtcagcgtcctcaccgtcctgcaccaggactggctgaatggcaaggagtacaagtgcaag
gtctccaacaaagccctcccagcccccatcgagaaaaccatctccaaagccaaagggcagccccga
gaaccacaggtgtacacgctgcccccatcccgggaggagatgaccaagaaccaggtcagcctgacct
gcctggtcaaaggcttctatcccagcgacatcgcgtggagtgggagagcaatgggcagccggagaac
aactacaagaccacgcctcccgtgctggactccgacggctccttcttcctctatagcaagctcaccgtgg
acaagagcaggtggcagcaggggaacgtcttctcatgctccgtgatgcatgaggctctgcacaaccact
acacgcagaagagcctctccctgtccccgggtaaatga

متوالية رقم :٣٨ عبارة عن متوالية الحمض الأميني منطقة ثابتة IgG1 توضحية بشرية.

ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGV
HTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKRVEPK
SCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHE
DPEVKFNWYVDGVEVHNVKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKE
YKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLV
KGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQ
QGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPGK

متوالية رقم :٣٩ عبارة عن متوالية حمض نووي تُشفر منطقة ثابتة ذات سلسلة خفيفة كابا بشرية توضيحية.

ACTGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAG
TTGAAATCTGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATC
CCAGAGAGGCCAAAGTACAGTGGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCG
GGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGCAAGGACAGCAC
CTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGA
AACACAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCG
CCCGTCACAAAGAGCTTCAACAGGGGAGAGTGTTAG

متوالية رقم :٤٠ عبارة عن متوالية الحمض الأميني لمنطقة ثابتة ذات سلسلة خفيفة كابا بشرية توضيحية.

TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGN
SQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKS
FNRGEC

تعريفات

تكون الوحدة البنائية الأساسية للجسم المضاد basic antibody structural unit عبارة عن تشكيل رباعي الوحدات للوحدات الفرعية subunits tetramer. يتضمن كل تشكيل رباعي الوحدات زوجين متماثلة من سلاسل بولي ببتيد، يكون لكل زوج سلسلة "" خفيفة" واحدة (حوالي ٢٥ كيلو دالتون kDa) وسلسلة "ثقيلة" واحدة (حوالي ٥٠-٧٠ كيلو دالتون kDa). يتضمن الجزء الطرفي -الأميني لكل سلسلة منطقة متغيرة تتراوح من حوالي ١٠٠ إلى ١١٠ أو أكثر من الأحماض الأمينية المسئولة بصورة أولية عن تمييز مولد الضد. عند التعبير الوراثي في البداية، تتربط المنطقة المتغيرة بصورة نمطية ببتيد إشارة قابلة للانشطار. يتم عادةً الإشارة إلى المنطقة المتغيرة التي لا تتضمن ببتيد إشاري في بعض الأحيان بتعبير منطقة متغيرة ناضجة. بالتالي، على سبيل المثال، تعني المنطقة المتغيرة الناضجة لسلسلة خفيفة المنطقة المتغيرة خفيفة السلسلة

بدون ببتيد إشارة خفيف السلسلة. يحدد الجزء الطرفي- كربوكسي لكل سلسلة منطقة ثابتة مسئولة بصورة أولية عن وظيفة المؤثر. يمكن أن تتضمن المنطقة الثابتة أي أو جميع منطقة CH1، منطقة مفصلية، منطقة CH2، و منطقة CH3.

يتم تصنيف السلاسل الخفيفة بانها سلاسل كابا أو لمدا. يتم تصنيف السلاسل الثقيلة بتعبير جاما، mu، ألفا، دلتا، أو إيبسيلون، وتحدد النمط المماثل للجسم المضاد كـIgG ، IgM،IgA، IgD و IgE، على التوالي. داخل السلاسل الخفيفة والثقيلة، يتم توصيل المناطق الثابتة والمتغيرة بواسطة منطقة "J" لحوالي ١٢ أو أكثر من الأحماض الأمينية، باستخدام سلسلة ثقيلة التي تتضمن أيضاً منطقة"D" لحوالي ١٠ أو أكثر من الأحماض الأمينية. (انظر بوجه عام:

Fundamental Immunology (Paul, W., ed., 2nd ed. Raven Press, N.Y., 1989), Ch. 7)

(المستخدمة هنا كمرجع في مجملها لجميع الأغراض).

تُشكل المناطق المتغيرة الناضجة لكل زوج من السلسلة الخفيفة والثقيلة موضع ربط الجسم المضاد. بالتالي، يكون للجسم المضاد السليم موضعي ربط. باستثناء الأجسام المضادة ثنائية النوعية أو الوظيفة، يكون موضعي الارتباط متشابهين. تظهر السلاسل جميعها نفس الصيغة البنائية العامة لمناطق إدارية محافظة نسبية(FR) framework regions المرتبطة بواسطة ثلاث مناطق مفرطة التغيير، والتي تسمى أيضاً مناطق تحديد تكميلية أو (CDRs). تتم محاذاة (CDRs) التي تم الحصول عليها من سلسلتين لكل زوج بواسطة مناطق إطارية، مما يساعد على الارتباط بقمة لاصقة محددة. من الطرف N إلى الطرف C، تشتمل كلا السلاسل الخفيفة والثقيلة وتشتمل على مناطق FR1، تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (1(FR2،CDR ، تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (2(FR3،CDR ، تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (3(CDR وFR4. تتم تسمية كل من الأحماض الأمينية لكل منطقة وفقاً لتعريفات Kabat، متواليات البروتين ذات الأهمية المناعية: (National Institutes لـ1991 and 1987 ,Health, Bethesda, MD، أو :

Chothia & Lesk, J. Mol. Biol. 196:901-917 (1987); Chothia et al., Nature 342:878-883 (1989).

توفر Kabat أيضاً اتفاقية الترقيم المستخدمة على نطاق عريض (ترقيم Kabat) حيث تكون الوحدات البنائية المناظرة بين سلسلتين ثقيلتين مختلفتين أو بين سلسلتين خفيفتين مختلفتين مخصصة بنفس الرقم (مثل، يعني H83 موضع ٨٣ بواسطة ترقيم Kabat في منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة ناضجة؛ على غرار ذلك يعني L36 موضع ٣٦ بواسطة ترقيم Kabat في منطقة متغيرة ذات سلسلة خفيفة ناضجة). يتم استخدام ترقيم Kabat بصورة شاملة للإشارة إلى المواضع المذكورة في المنطقة المتغيرة للجسم المضاد ما لم يتم ذكر خلاف ذلك بوضوح.

يتضمن التعبير " جسم مضاد" أجسام مضادة سليمة وشظايا ارتباط منها. بصورة نمطية، شظايا تتنافس مع الجسم المضاد السليم والتي تم اشتقاقها منه للارتباط النوعي بالهدف. تتضمن شظايا سلاسل ثقيلة منفصلة، سلاسل خفيفة منفصلة، Fab'،Fab ،F(ab')2 ، F(ab)c، Fv، أجسام مضادة ذات سلسلة مفردة، و أجسام مضادة أحادية النطاق. تتضمن الأجسام المضادة أحادي النطاق (المتغيرة) مناطق VH منفصلة عن شركاء VL الخاصة بها (أو العكس صحيح) في الأجسام المضادة التقليدية (:

Ward et al., 1989, Nature 341: 544-546)، وكذلك مناطق VH (المعروفة عادةً بـ VHH) من أنواع مثل الجمليات أو أسماك غضروفية (مثل، الأسماك المفترسة الرضيعة) حيث تكون مناطق VH غير مرتبطة بمناطق VL (انظر، على سبيل المثال، الطلب الدولي رقم ٩٤٠٤٦٧٨). في بعض الأحيان تكون الأجسام المضادة أحادية النطاق التي تكون فيها سلسلة واحدة منفصلة عن الشركاء الطبيعين لهم معروفة بـDabs وتكون الأجسام المضادة أحادية النطاق التي تم الحصول عليها من الجمليات أو أسماك غضروفية في بعض الأحيان معروفة كـ أجسام متناهية الصغر. يمكن أن توجد مناطق ثابتة أو أجزاء من مناطق ثابتة أو لا توجد في أجسام مضادة أحادية النطاق. على سبيل المثال، تتضمن الأجسام المضادة ذات المنطقة المتغيرة المفردة الطبيعية التي تم الحصول عليها من الجمليات منطقة متغيرة VHH، ومناطق ثابتة CH2 و CH3. يمكن أن تخضع الأجسام المضادة أحادية النطاق، مثل أجسام متناهية الصغر، لخطوة توافق مع البشر بواسطة طرق مناظرة للأجسام المضادة التقليدية. عادةً يتم الحصول على الأجسام المضادة Dabs من الأجسام المضادة من أصل بشري. يمكن إنتاج شظايا بواسطة تقنيات DNA

الناتجة عن عودة الارتباط الجيني، أو بواسطة الفصل الإنزيمي أو الكيميائي للجلوبيولينات المناعية السليمة.

يتضمن التعبير " جسم مضاد" أيضاً جسم مضاد ثنائي النوعية bispecific antibody و/ أو جسم مضاد متوافق مع البشر humanized antibody. يكون الجسم المضاد ثنائي النوعية bispecific antibody أو ثنائي الوظيفة bifunctional عبارة عن جسم مضاد هجين صناعي artificial hybrid antibody يتضمن اثنين من أزواج ثقيلة/خفيفة السلسلة مختلفة واثنين من مواضع الربط المختلفة (انظر، على سبيل المثال :

Songsivilai and Lachmann, Clin. Exp. Immunol., 79:315-321 (1990); Kostelny et al., J. Immunol. 148:1547-53 (1992)).

في بعض الأجسام المضادة ثنائية النوعية، يتضمن اثنين من الأزواج ثقيلة/خفيفة السلسلة المختلفة سلسلة خفيفة 5C1 متوافقة مع البشر/ زوج من السلاسل الخفيفة والثقيلة/ زوج سلسلة خفيفة خاص بقمة لاصقة مختلف على ألفا سينوكلين بدلاً من المرتبط بواسطة 5C1.

في بعض الأجسام المضادة ثنائية النوعية، تكون زوج خفيف وثقيل السلسلة عبارة عن جسم مضاد 5C1 متوافق مع البشر كما تم التوضيح فيما يلي و يتم الحصول على زوج خفيف وثقيل السلسلة من جسم مضاد يرتبط بمستقبل يتم التعبير عنه على حاجز مخ الدم blood brain barrier ، مثل مستقبل إنسولين insulin receptor ، مستقبل عامل نمو شبيه الإنسولين insulin-like growth factor (IGF) receptor ، مستقبل ليبتين leptin receptor ، أو مستقبل بروتين شحمي lipoprotein receptor ، أو مستقبل ترانسفيرين transferrin receptor:

(Friden et al., PNAS 88:4771-4775, 1991; Friden et al., Science 259:373-377, 1993).

يمكن نقل الجسم المضاد ثنائي النوعية bispecific antibody المذكور عبر حاجز مخ الدم التقام الخلايا العابر المساهم فيه بواسطة مستقبل. يمكن أيضاً تعزيز الامتصاص في المخ للجسم المضاد ثنائي النوعية بواسطة التحوير الوراثي جسم مضاد ثنائي النوعية لتقليل ألفته مع مستقبل

حاجز مخ الدم. تؤدي الألفة المنخفضة للمستقبل إلى التوزيع الشامل في المخ (انظر، على سبيل المثال:

Atwal. et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra43, 2011; Yu et al. Sci. Trans. Med. 3, 84ra44, 2011).

٥ يمكن أيضاً أن تكون الأجسام المضادة ثنائية النوعية التوضيحية (١) جسم مضاد لنطاق-متغير-مزدوج(DVD-Ig) dual-variable-domain antibody ، حيث تتضمن كل سلسلة خفيفة وثقيلة اثنين من النطاقات المتغيرة ترادفياً من خلال رابطة ببتيد قصيرة:

(Wu et al., Generation and Characterization of a Dual Variable Domain Immunoglobulin (DVD-Ig™) Molecule, In: Antibody Engineering, Springer Berlin Heidelberg (2010));

١٠

(٢)Tandab ، والذي يكون عبارة عن اندماج لاثنين من الأجسام الثنائية أحادية السلسلة التي تؤدي إلى جسم مضاد ثنائي النوعية رباعي التكافؤ والذي يكون له موضع ربط لكل من مولدات الضد المستهدفة؛ (٣) جسم مرن، والذي يكون عبارة عن توليفة من scFvs مع الجسم الثنائي الذي يؤدي إلى جزيء متعدد التكافؤ؛ (٤) والذي يسمى جزيء "القطع والتثبيت"، على أساس "

١٥ نطاق الديمرة والقطع" في بروتين كيناز A، والتي، عند استخدامها على Fabs، يمكن أن توفر بروتين ربط ثنائي النوعية رباعي التكافؤ يتكون من اثنين من الشظايا المتماثلةFab s المرتبطة بشظية مختلفة Fab؛ (٥) تسمى أيضاً جزيء عقربي الشكل، يشتمل على سبيل المثال على، اثنين من scFvs المدمجة مع طرفي منطقة Fc البشرية. تتضمن أمثلة النظم الأساسية النافعة في تحضير الأجسام المضادة ثنائية النوعية BiTE (Micromet)، DART (MacroGenics)،

٢٠ Fcab و Mab2(F-star)،IgGl محور وراثياً بـ Fc (Xencor) أو DuoBody(على أساس تبادل مجموعة Fab،Genmab).

يكون "مولد الضد" عبارة عن كيان يرتبط به الجسم المضاد على وجه التحديد.

يشير التعبير" قمة لاصقة" إلى موضع على مولد ضد يرتبط به الجسم المضاد. بالنسبة لمولدات ضد البروتين، يمكن تشكيل قمة لاصقة من أحماض أمينية متماسة أو أحماض أمينية غير

متماسة المتجاورة بواسطة الطي الثلاثي لواحدة أو أكثر من البراوتينات. يتم عادة الاحتفاظ بالقمم اللاصقة المكونة من أحماض أمينية متماسة عند التعرض لمذيبات تغيير الخواص الطبيعية، بينما يتم عادةً فقد القمم اللاصقة المكونة بواسطة الطي الثلاثي بصورة نمطية عند المعالجة باستخدام مذيبات تغيير الخواص الطبيعية. تتضمن القمة اللاصقة بصورة نمطية ٢، ٣، وأكثر على الأقل، ٥ على الأقل أو ٨-١٠ من الأحماض الأمينية في توافق حيزي فريد. تتضمن طرق تحديد التوافق الحيزي للقمم اللاصقة، على سبيل المثال، تصوير البلورات بالأشعة السينية X-ray crystallography والرنين المغناطيسي النووي ثنائي الأبعاد 2-dimensional nuclear magnetic resonance. انظر، على سبيل المثال، بروتوكولات تعيين قمة لاصقة، في طرق في Methods في Molecular Biology, Vol. 66, Glenn E. Morris, Ed. (1996). يمكن أن تتضمن القمة اللاصقة وحدة بنائية عند الطرف C أو وحدة بنائية عند الطرف N. يمكن أيضاً أن تتضمن القمة اللاصقة، ولكن ليس من الضروري أن تتضمن، المجموعة الأمينية الحرة لبولي ببتيد أو مجموعة كربوكسيلية حرة لبولي ببتيد. بالتالي، يمكن أن تتضمن القمة اللاصقة وحدة بنائية عند الطرف –C أو وحدة بنائية عند الطرف N، ولكن ليس من الضروري أن تتضمن المجموعة الكربوكسيلية الحرة أو المجموعة الأمينية الحرة، على التوالي. يتم في بعض الأحيان تعريف نوعية ارتباط الجسم المضاد بواسطة نطاق الأحماض الأمينية. إذا كان الجسم المضاد يرتبط بالقمة اللاصقة داخل الأحماض الأمينية ١١٨-١٢٦ لمتوالية رقم :١، على سبيل المثال، يعني ذلك أن القمة اللاصقة في النطاق المذكور للأحماض الأمينية التي تتضمن تلك التي تحدد الحدود الخارجية للنطاق. ليس من الضروري أن يعني ذلك أن كل حمض أميني داخل النطاق يُشكل جزء من القمة اللاصقة. بالتالي، على سبيل المثال، يمكن أن تتكون قمة لاصقة داخل الأحماض الأمينية ١١٨-١٢٦ لمتوالية رقم :١ من الأحماض الأمينية ١١٨-١٢٤، ١١٩-١٢٥، ١٢٠-١٢٦، ١٢٠-١٢٤، أو ١٢٠-١٢٢، من بين القطاعات الأخرى لمتوالية رقم :١.

يمكن تعريف الأجسام المضادة التي تمييزنفس القمم اللاصقة أو القمم اللاصقة المتراكبة في اختبار مناعي بسيط يظهر قدرة جسم مضاد واحد للتنافس مع ارتباط جسم مضاد آخر بمولد الضد المستهدف. يمكن تعريف القمة اللاصقة لجسم مضاد أيضاً بواسطة تصوير البلورات بالأشعة السينية للجسم المضاد المرتبط بمولد الضد له لتحديد المواد البنائية المتلامسة (القمة اللاصقة

المحددة بواسطة الوحدات البنائية التي تحدث التلامس). على نحو بديل، يكون لاثنين من الأجسام المضادة نفس القمة اللاصقة إذا كانت جميع طافرات الحمض الأميني في مولد الضد التي تقلل أو تمنع ارتباط جسم مضاد واحد تعمل على تقليل أو منع ارتباط بجسم مضاد آخر. يكون لاثنين من الأجسام المضادة قمم لاصقة متراكبة إذا كانت بعض طافرات الحمض الأميني التي تقلل أو تمنع ارتباط جسم مضاد واحد تعمل على تقليل أو منع الارتباط بجسم مضاد آخر.

يتم تحديد التنافس بين الأجسام المضادة بواسطة اختبار يقوم فيه جسم مضاد تحت الاختبار بتثبيط الارتباط النوعي لجسم مضاد مرجعي بمولد الضد المعروف. انظر، على سبيل المثال:

Junghans et al. (1990), Cancer Res. 50:1495. يتنافس الجسم المضاد للاختبار مع الجسم المضاد المرجعي في حالة قيام كمية زائدة من الجسم المضاد للاختبار (مثل، x٢، x٥، x١٠، x٢٠ أو x١٠٠ على الأقل) بتثبيط ارتباط الجسم المضاد المرجعي بمقدار ٥٠٪، ٧٥٪، ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٨٪، أو ٩٩٪ على الأقل كما تم القياس في اختبار الارتباط التنافسي. تتضمن الأجسام المضادة المحددة بواسطة الاختبار التنافسي (أجسام مضادة تنافسية) الأجسام المضادة المرتبطة بنفس القمة اللاصقة مثل الجسم المضاد المرجعي و الأجسام المضادة المرتبط بالقمة اللاصقة المجاورة القريبة بدرجة كافية من القمة اللاصقة المرتبط بواسطة الجسم المضاد المرجعي لحدوث إعاقة تفارغية.

بصورة نمطية ترتبط الأجسام المضادة للاختراع بالهدف المخصص لها بثابت ألفة يبلغ على الأقل ١٠ ٦، ١٠ ٧، ١٠ ٨، ١٠ ٩، أو ١٠ ١٠ مولار-١. يكون الارتباط المذكورة عبارة عن ارتباط نوعي حيث يكون مرتفع بشكل قابل للكشف من حيث المقدار والقدرة على التمييز عن الارتباط غير النوعي الذي يحدث في هدف غير ذي صلة واحد على الأقل. يمكن أن يكون الارتباط النوعي ناتج عن تكوين روابط بين مجموعات وظيفية محددة أو تركيبة حيزية محددة (مثل، من نوع قفل ومفتاح) بينما يكون الارتباط غير النوعي عادةً ناتج عن قو ىvan der Waals . من ثم ليس من الضروري أن يتضمن الارتباط النوعي أن يرتبط الجسم المضاد أحادي النسيلة بهدف واحد فقط.

عند مقارنة متواليات الجسم المضاد، فيتم تحديد نسب تطابق المتوالية مع متواليات الجسم المضاد التي تمت محاذاتها بأقصى شكل بواسطة اتفاقية ترقيم Kabat. بعد المحاذاة، إذا تمت مقارنة منطقة الجسم المضاد للخاضع (مثل، المنطقة المتغيرة الناضجة الكلية لسلسلة خفيفة أو ثقيلة) مع نفس المنطقة لجسم مضاد مرجعي، فتكون نسبة متوالية تطابق المتوالية بين الخاضع و منطقة الجسم المضاد المرجعي عبارة عن عدد المواضع التي تم شغلها بواسطة نفس الحمض الأميني في كل من منطقة الجسم المضاد للخاضع والجسم المضاد المرجعي مقسومة على إجمالي عدد المواضع المحاذية لمنطقتين، مع عدم عد الفجوات، وضربها في ١٠٠ للتحويل إلى نسبة مئوية.

لأغراض تصنيف استبدالات الأحماض الدهنية باعتبارها أحماض دهنية محافظة أو غير محافظة، يتم تصنيف الأحماض الأمينية كما يلي: مجموعة ١ (سلاسل جانبية غير آلفة للماء neutral (hydrophilic side chains: met، ala، val، leu، ile ؛ مجموعة ٢(سلاسل جانبية آلفة للماء طبيعية) cys: ser، thr ؛ مجموعة ٣ (سلاسل جانبية حمضية): asp، glu؛ مجموعة ٤(سلاسل جانبية قاعدية basic side chains): asn،gln، his، lys، arg ؛ مجموعة ٥(وحدات بنائية تؤثر على اتجاه السلسلة residues influencing chain orientation): gly، pro؛ و مجموعة ٦ (سلاسل جانبية عطرية aromatic side chains): trp: ، tyr، phe . تتضمن الاستبدالات المحافظة استبدالات بين الأحماض الأمينية في نفس الفئة. تُشكل الاستبدالات غير المحافظة تبادل عضو لواحدة من تلك الفئات بعضو آخر في فئة أخرى.

بصورة نمطية يتم توفير الأجسام المضادة أحادية النسيلة في صورة معزولة. يعني ذلك أن الجسم المضاد يكون نقي بدرجة ٥٠٪ وزن/ وزن من البروتينات المتداخلة و الملوثات الأخرى التي تظهر عن إنتاجها أو تنقيتها، ولكن لا تستبعد احتمالية دمج العامل مع كمية زائدة من مادة (مواد) حاملة مقبولة صيدلانياً أو سواغ يهدف إلى تسهيل استخدامه. في بعض الأحيان تبلغ الأجسام المضادة أحادية النسيلة ٦٠٪، ٧٠٪، ٨٠٪، ٩٠٪، ٩٥٪، ٩٦٪، ٩٧٪، ٩٨٪، أو ٩٩٪ وزن/ وزن على الأقل من نقاء نواتج التكتل أو شظايا الأجسام المضادة أحادية النسيلة المذكورة أو ملوثات البروتينات الأخرى. يمكن أن تتضمن بعض الأجسام المضادة أحادية النسيلة المذكورة نواتج تكتل أو شظايا ولكن تبلغ ٩٩٪ وزن/ وزن على الأقل من نقاء البروتينات والملوثات الأخرى.

يمكن أن تتضمن التركيبات والطرق" التي تشتمل على" واحد أو أكثر من العناصر المذكورة عناصر أخرى غير مذكورة على وجه التحديد. على سبيل المثال، يمكن أن تتضمن التركيبة التي تشتمل على جسم مضاد الجسم المضاد بمفرده أو في توليفة مع مكونات أخرى.

تتضمن تسمية نطاق القيم جميع الأعداد الصحيحة داخل أو التي تحدد النطاق، وجميع النطاقات الفرعية المحددة بواسطة الأعداد الصحيحة داخل النطاق.

ما لم يتضح خلاف ذلك بوضوح من السياق، يتضمن التعبير "حوالي" قيم داخل هامش خطأ القياس(SEM) لقيمة مذكورة.

تعني الأهمية الإحصائية $p \leq ٠,٠٥$. يتضمن تعبير مريض" أيضاً خاضع بشري أو ثديي آخر يتلقى معالجة علاجية أو وقائية. يكون الفرد عرضة لخطورة الإصابة بالمرض إذا كان الخاضع لدية عامل خطورة واحد على الأقل (مثل، وراثي genetic ، كيميائي حيوي biochemical ، تاريخ عائلي family history ، التعرض اللحظي situational exposure) مما يجعل المرضى الذين يعانون من عامل الخطورة عند خطورة مرتفعة بصورة كبيرة من الناحية الإحصائية لتطوير المرض مقارنةً بالمرضى الذين لا يعانين عامل الخطورة.

يشير التعبير" عرض" إلى دليل خاص على المرض، مثل تغير المشية، كما يلاحظها المريض. يشير "علامة" إلى دليل موضوعي على المرض كما تتم الملاحظة بواسطة الطبيب.

تشير" وظيفة إدراكية cognitive function" إلى عمليات ذهنية مثل مشكلات الانتباه، الذاكرة، التحدث وفهم اللغة، حل المشكلات، ومع الأخذ في الاعتبار محيط الفرد والعناية بالفرد.

تشير " وظيفة إدراكية معززة enhanced cognitive function" أو " وظيفة إدراكية محسنة improved cognitive function " إلى تحسن بالنسبة للقيمة الأولية، على سبيل المثال، تشخيص أو بدء المعالجة. يشير " انخفاض الوظائف الإدراكية" إلى انخفاض في الوظيفة بالنسبة للقيمة الأولية المذكورة. في نظم النماذج الحيوانية مثل جرذ أو فأر، يمكن أن يكون قياس الوظيفة الإدراكية عبارة عن طرق قياس تتضمن متاهة يستخدم فيها الخاضعين معلومات حيزية (مثل، متاهة الماء لـ Morris، متاهة دائرية Barnes، متاهة مجموعة قطرية مرتفعة، متاهة T وغيرها)، ضبط الخوف fear conditioning ، تجنب النشاط active avoidance ، مجال مفتوح مضيء

illuminated open-field ، مقياس النشاط في الظلام dark activity meter ، متاهة إضافية مرتفعة elevated plus-maze ، اختبار استكشافي ثنائي الحجرات two-compartment exploratory test أو اختبار العوم الإجباري forced swimming test.

في الكائنات البشرية، يمكن قياس الوظيفة الإدراكية بواسطة واحد أو أكثر من للعديد من الاختبارات القياسية. تم وصف أمثلة اختبار أو تجربة الوظيفة الإدراكية (:

(Ruoppila and Suutama, Scand. J. Soc. Med. Suppl. 53,44-65, 1997

وتتضمن اختبارات نفسية قياسية psychometric tests (مثل :

Wechsler Adult Intelligence Scale, Raven's Standard Progressive Matrices, Schaie-Thurstone Adult Mental Abilities Test)

الاختبارات النفسية العصبية neuropsychological tests (مثل Luria-Nebraska)، تقييمات الذات فوق الإدراكيةmetacognitive self-evaluations (مثل استفسارات فوق الذاكرة Metamemory Questionnaire)، اختبارات الفحص الحيزي البصري-visual spatial screening tests(مثل أشكال Poppelreuter's، تمييز الساعة، رسمه شمع العسل والإلغاء)، اختبارات الفحص الإدراكيةcognitive screening tests (مثل اختبار Folstein's Mini Mental State Test) واختبارات زمن التفاعل reaction time tests.

تتضمن الاختبارات الأخرى لقياس الأداء الإدراكي التدرج الفرعي المعرفي لتدرج قياس مرض الزهايمر Alzheimer's Disease Assessment Scale-cognitive subscale (ADAS-cog)؛ الانطباع الإكلينيكي الشامل لتدرج التغير clinical global impression of change scale (تدرج إضافيCIBIC)؛ نشاطات الدراسة المشتركة لمرض الزهايمر لتدرج البقاء اليومي Alzheimer's Disease Cooperative Study Activities of Daily Living Scale (ADCS-ADL)؛ اختبار الحالة العقلية المبسط(MMSE) Mini Mental State Exam ؛ المخزون النفسي العصبي(NPI) Neuropsychiatric Inventory ؛ تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي(تدرج تصنيف العتة الإكلينيكي (CDR))؛ بطارية آليى لاختبار نفسي عصبي كامبريدج Cambridge Neuropsychological Test Automated Battery (CANTAB) أو تقييم

إكلينيكي (SCAG) Sandoz Clinical Assessment– Geriatric، اختبار Stroop، عمل المحاولات، Wechsler Digit Span ، واختبار معرفي بالكمبيوتر CogState. بالإضافة إلى ذلك، يمكن قياس الوظيفة الإدراكية باستخدام تقنيات التصوير مثل التصوير الشعاعي الطبقي بانبعاث جزيء شحنة موجبة(PET) Positron Emission Tomography ، التصوير بالرنين

٥ المغناطيسي الوظيفي(fMRI) functional magnetic resonance imaging ، التصوير الشعاعي الطبقي بالكمبيوتر بانبعاث الفوتون المفرد (التصوير الطبي بأشعة جاما SPECT) (SPECT) Single Photon Emission Computed Tomography، أو أي تقنية تصوير أخرى تسمح بقياس وظيفة المخ.

قائمة متواليات

<110> NEOTOPE BIOSCIENCES LIMITED

BARBOUR, ROBIN

GAMES THIEL, KATE DORA

NIJJAR, TARLOCHAN, S.

<120> ANTIBODIES RECOGNIZING ALPHA-SYNUCLEIN

<130> 057450/437818

<140> PCT/US2013/063945

<141> 2013-10-08

<150> 61/711,204

<151> 2013-10-08

<150> 61/719,281

<151> 2012-10-26

<150> 61/840,432

<151> 2013-06-27

<150> 61/872,366

<151> 2013-08-30

<160> 41

<170> FastSEQ for Windows Version 4.0

<210> 1

<211> 140

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<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> 35

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 2

Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr Ala

1 5 10 15

Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser Ile Ala Ala Ala Thr

20 25 30

Gly Phe Val

35

<210> 3

<211> 28

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 3

Lys Glu Gln Val Thr Asn Val Gly Gly Ala Val Val Thr Gly Val Thr

1 5 10 15

Ala Val Ala Gln Lys Thr Val Glu Gly Ala Gly Ser

20 25

<210> 4

<211> 12

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 4

Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu Gly Gly Cys

1 5 10

<210> 5

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 5

atggaaaggc actggatctt tctcttcctg ttatcagtaa ctggaggtgt ccactcccag 60

gtccagctgc agcagtctgg ggctgaactg gcaaaacctg ggacctcagt gcagatgtcc 120

tgcaaggctt ctggctacac ctttactaat tactggatga actggataaa agcgaggcct 180

ggacagggtc tggaatggat tggggctact aatcctaaca atggttatac tgactacaat 240

cagaggttca aggacaaggc catattaact gcagacaaat cctccaatac agcctacatg 300

cacctgagca gcctgacatc tgaagactct gcagtctatt tctgtgcaag tgggggggcac 360

ttggcttact ggggccaggg gactgtggtc actgtctctg ca 402

<210> 6

<211> 134

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 6

Met Glu Arg His Trp Ile Phe Leu Phe Leu Leu Ser Val Thr Gly Gly

1 5 10 15

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

20 25 30

Pro Gly Thr Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe

35 40 45

Thr Asn Tyr Trp Met Asn Trp Ile Lys Ala Arg Pro Gly Gln Gly Leu

50 55 60

Glu Trp Ile Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn

65 70 75 80

Gln Arg Phe Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn

85 90 95

Thr Ala Tyr Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val

100 105 110

Tyr Phe Cys Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr

115 120 125

Val Val Thr Val Ser Ala

130

<210> 7

<211> 393

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 7

atgaagttgc ctgttaggct gttggtgctg atgttctgga ttcctgcttc cagcagtgat 60

gttgtgatga cccaaattcc actctacctg tctgtcagtc ctggagatca agcctccatc 120

tcttgcagat ctagtcagag ccttttccat agtaaaggaa acacctattt acattggtat 180

ctgcagaagc caggccagtc tccaaagctc ctgatcaaca gggtttccaa ccgattttct 240

ggggtcccag acaggttcag tggcagtgga tcagggacag atttcacact caagatcagc 300

ggagtggagg ctgaagatct gggagtttat ttctgttctc aaagtgcaca tgttccgtgg 360

acgttcggtg gaggcaccaa gctggaaatc aga 393

<210> 8

<211> 131

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 8

Met Lys Leu Pro Val Arg Leu Leu Val Leu Met Phe Trp Ile Pro Ala

1 5 10 15

Ser Ser Ser Asp Val Val Met Thr Gln Ile Pro Leu Tyr Leu Ser Val

20 25 30

Ser Pro Gly Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu

35 40 45

Phe His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro

50 55 60

Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Asn Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

65 70 75 80

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr

85 90 95

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

100 105 110

Ser Gln Ser Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu

115 120 125

Glu Ile Arg

130

<210> 9

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 9

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

1 5 10 15

Ser Val Gln Met Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Ile Lys Ala Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

Lys Asp Lys Ala Ile Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met His Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Val Val Thr

100 105 110

Val Ser Ala

115

<210> 10

<211> 5

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 10

Asn Tyr Trp Met Asn

1 5

<210> 11

<211> 17

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 11

Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe Lys

1 5 10 15

Asp

<210> 12

<211> 6

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 12

Gly Gly His Leu Ala Tyr

1 5

<210> 13

<211> 118

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 13

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Gly Thr Phe Asn Asn Tyr

20 25 30

Ala Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

35 40 45

Gly Gly Ile Ile Pro Ile Phe Gly Thr Thr Thr Tyr Ala Gln Lys Phe

50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Glu Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Glu Gly Asn Leu Asn Trp Leu Asp Pro Trp Gly Gln Gly Thr

100 105 110

Leu Val Thr Val Ser Ser

115

<210> 14

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 14

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 15

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 15

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Arg Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 16

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 16

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 17

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 17

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 18

<211> 115

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 18

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

1 5 10 15

Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr

20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile

35 40 45

Gly Ala Thr Asn Pro Asn Asn Gly Tyr Thr Asp Tyr Asn Gln Arg Phe

50 55 60

Lys Asp Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Asn Thr Ala Tyr

65 70 75 80

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

85 90 95

Ala Ser Gly Gly His Leu Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr

100 105 110

Val Ser Ser

115

<210> 19

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 19

atggagttcg gcctgtcctg gctgttcctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60

gtgcagctgg tgcagtccgg cgccgagctg aagaagcccg gctcctccgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactggatga actgggtgcg ccaggccccc 180

ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240

cagcgcttca aggaccgcgc caccctgacc gccgacaagt ccaccaacac cgcctacatg 300

gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg cggcggccac 360

ctggcctact ggggccaggg caccctggtg accgtgtcct cc 402

<210> 20

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 20

atggagttcg gcctgtcctg gctgttcctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60

gtgcagctgg tgcagtccgg cgccgagctg aagaagcccg gctcctccgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactggatga actgggtgcg ccaggccccc 180

ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240

cagcgcttca aggaccgcgt gaccatcacc gccgacaagt ccaccaacac cgcctacatg 300

gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcccg cggcggccac 360

ctggcctact ggggccaggg caccctggtg accgtgtcct cc 402

<210> 21

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 21

atggagttcg gcctgtcctg gctgttcctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60

gtgcagctgg tgcagtccgg cgccgagctg aagaagcccg gctcctccgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactggatga actgggtgcg ccaggccccc 180

ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240

cagcgcttca aggaccgcgc caccctgacc gccgacaagt ccaccaacac cgcctacatg 300

gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact tctgcgcctc cggcggccac 360

ctggcctact ggggccaggg caccctggtg accgtgtcct cc 402

<210> 22

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 22

atggagttcg gcctgtcctg gctgttcctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60

gtgcagctgg tgcagtccgg cgccgagctg aagaagcccg gctcctccgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactggatga actgggtgcg ccaggccccc 180

ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240

cagcgcttca aggaccgcgc caccctgacc gccgacaagt ccaccaacac cgcctacatg 300

gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact actgcgcctc cggcggccac 360

ctggcctact ggggccaggg caccctggtg accgtgtcct cc 402

<210> 23

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 23

atggagttcg gcctgtcctg gctgttcctg gtggccatcc tgaagggcgt gcagtgccag 60

gtgcagctgg tgcagtccgg cgccgagctg aagaagcccg gctcctccgt gaaggtgtcc 120

tgcaaggcct ccggctacac cttcaccaac tactggatga actgggtgcg ccaggccccc 180

ggccagggcc tggagtggat cggcgccacc aaccccaaca acggctacac cgactacaac 240

cagcgcttca aggaccgcgt gaccatcacc gccgacaagt ccaccaacac cgcctacatg 300

gagctgtcct ccctgcgctc cgaggacacc gccgtgtact actgcgccag cggcggccac 360

ctggcctact ggggccaggg caccctggtg accgtgtcct cc 402

<210> 24

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 24

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser
20 25 30

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

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

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

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

Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Arg
100 105 110

<210> 25

<211> 16

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 25

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His

1 5 10 15

<210> 26

<211> 7

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 26

Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser

1 5

<210> 27

<211> 9

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 27

Ser Gln Ser Ala His Val Pro Trp Thr

1 5

<210> 28

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 28

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Leu His Ser

20 25 30

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

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Leu Gly Ser Asn Arg Ala Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Leu Gln Thr Pro Pro Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 29

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 29

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser

20 25 30

Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Asn Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 30

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 30

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser

20 25 30

Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 31

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 31

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser

20 25 30

Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Asn Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 32

<211> 112

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 32

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

1 5 10 15

Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Phe His Ser

20 25 30

Lys Gly Asn Thr Tyr Leu His Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35 40 45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Arg Phe Ser Gly Val Pro

50 55 60

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

65 70 75 80

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

85 90 95

Ala His Val Pro Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys

100 105 110

<210> 33

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 33

atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60

tccggcgacg tggtgatgac ccagtccccc ctgtccctgt ccgtgtcccc cggcgagccc 120

gcctccatct cctgccgctc ctcccagtcc ctgttccact ccaagggcaa cacctacctg 180

cactggtacc tgcagaagcc cggccagtcc cccaagctgc tgatcaaccg cgtgtccaac 240

cgcttctccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccctg 300

aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact tctgctccca gtccgcccac 360

gtgccctgga ccttcggcgg cggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 34

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 34

atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60

tccggcgaca tcgtgatgac ccagtccccc ctgtccctgt ccgtgtcccc cggcgagccc 120

gcctccatct cctgccgctc ctcccagtcc ctgttccact ccaagggcaa cacctacctg 180

cactggtacc tgcagaagcc cggccagtcc cccaagctgc tgatctaccg cgtgtccaac 240

cgcttctccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccctg 300

aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctccca gtccgcccac 360

gtgccctgga ccttcggcgg cggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 35

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 35

atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60

tccggcgacg tggtgatgac ccagtccccc ctgtccctgt ccgtgtcccc cggcgagccc 120

gcctccatct cctgccgctc ctcccagtcc ctgttccact ccaagggcaa cacctacctg 180

cactggtacc tgcagaagcc cggccagtcc ccccagctgc tgatcaaccg cgtgtccaac 240

cgcttctccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccctg 300

aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact tctgctccca gtccgcccac 360

gtgccctgga ccttcggcgg cggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 36

<211> 402

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 36

atggacatgc gcgtgcccgc ccagctgctg ggcctgctga tgctgtgggt gtccggctcc 60

tccggcgaca tcgtgatgac ccagtccccc ctgtccctgt ccgtgtcccc cggcgagccc 120

gcctccatct cctgccgctc ctcccagtcc ctgttccact ccaagggcaa cacctacctg 180

cactggtacc tgcagaagcc cggccagtcc ccccagctgc tgatctaccg cgtgtccaac 240

cgcttctccg gcgtgcccga ccgcttctcc ggctccggct ccggcaccga cttcaccctg 300

aagatctccc gcgtggaggc cgaggacgtg ggcgtgtact actgctccca gtccgcccac 360

gtgccctgga ccttcggcgg cggcaccaag gtggagatca ag 402

<210> 37

<211> 991

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 37

gcctccacca agggcccatc ggtcttcccc ctggcaccct cctccaagag cacctctggg 60

ggcacagcgg ccctgggctg cctggtcaag gactacttcc ccgaaccggt gacggtgtcg 120

tggaactcag gcgccctgac cagcggcgtg cacaccttcc cggctgtcct acagtcctca 180

ggactctact ccctcagcag cgtggtgacc gtgccctcca gcagcttggg cacccagacc 240

acatctgcaa cgtgaatcac aagcccagca acaccaaggt ggacaagaga gttgagccca 300

aatcttgtga caaaactcac acatgcccac cgtgcccagc acctgaactc ctgggggggac 360

cgtcagtctt cctcttcccc ccaaaaccca aggacaccct catgatctcc cggacccctg 420

aggtcacatg cgtggtggtg gacgtgagcc acgaagaccc tgaggtcaag ttcaactggt 480

acgtggacgg cgtggaggtg cataatgtca agacaaagcc gcgggaggag cagtacaaca 540

gcacgtaccg tgtggtcagc gtcctcaccg tcctgcacca ggactggctg aatggcaagg 600

agtacaagtg caaggtctcc aacaaagccc tcccagcccc catcgagaaa accatctcca 660

aagccaaagg gcagccccga gaaccacagg tgtacacgct gcccccatcc cgggaggaga 720

tgaccaagaa ccaggtcagc ctgacctgcc tggtcaaagg cttctatccc agcgacatcg 780

cgtggagtgg gagagcaatg ggcagccgga gaacaactac aagaccacgc ctcccgtgct 840

ggactccgac ggctccttct tcctctatag caagctcacc gtggacaaga gcaggtggca 900

gcaggggaac gtcttctcat gctccgtgat gcatgaggct ctgcacaacc actacacgca 960

gaagagcctc tccctgtccc cgggtaaatg a 991

<210> 38

<211> 330

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 38

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys

1 5 10 15

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr

20 25 30

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser

35 40 45

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser

50 55 60

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr

65 70 75 80

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys

85 90 95

Arg Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys

100 105 110

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro

115 120 125

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys

130 135 140

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp

145 150 155 160

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Val Lys Thr Lys Pro Arg Glu

165 170 175

Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu

180 185 190

His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn

195 200 205

Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly

210 215 220

Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu

225 230 235 240

Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr

245 250 255

Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn

260 265 270

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe

275 280 285

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

290 295 300

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr

305 310 315 320

Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys

325 330

<210> 39

<211> 321

<212> DNA

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 39

actgtggctg caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 60

actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa agtacagtgg 120

aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga gtgtcacaga gcaggacagc 180

aaggacagca cctacagcct cagcagcacc ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa 240

cacaaagtct acgcctgcga agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc 300

ttcaacaggg gagagtgtta g 321

<210> 40

<211> 106

<212> PRT

<213> Artificial Sequence

<220>

<223> Synthesized

<400> 40

Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln

1 5 10 15

Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr

20 25 30

Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser

35 40 45

Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr

50 55 60

Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys

65 70 75 80

His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro

85 90 95

Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys

100 105

<210> 41

<211> 9

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 41

Val Asp Pro Asp Asn Glu Ala Tyr Glu

عناصر الحماية

١- جسم مضاد أحادي النسيلة معزول isolated monoclonal antibody يرتبط بألفا سينوكلين بشري human alpha synuclein عند قمة لاصقة epitope تتكون من الوحدات البنائية residues ١٢٠-١٢٤ لمتوالية رقم:١.

٢- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١، والذي يكون عبارة عن جسم مضاد خيمري chimeric antibody، مكسو veneered، متوافق مع البشر humanized، أو بشري.

٣- جسم مضاد antibody يشتمل على ثلاث سلاسل خفيفة CDRs كما تم التحديد بواسطة Kabat وثلاث سلاسل ثقيلة CDRs كما تم التحديد بواسطة Kabat للجسم المضاد أحادي النسيلة 5C1 monoclonal antibody، حيث يكون 5C1 عبارة عن جسم مضاد فأري mouse antibody يتميز بوجود منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة heavy chain variable region بها متوالية حمض أميني amino acid sequence تشتمل على متوالية رقم: ٩ ومنطقة متغيرة خفيفة السلسلة light chain variable region بها متوالية حمض أميني تشتمل على متوالية رقم: ٢٤.

٤- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ٣ بحيث يكون عبارة عن 5C1 أو صورة جسم مضاد خيمري chimeric antibody form، مكسو veneered، متوافق مع البشر humanized منه.

٥- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يكون الجسم المضاد عبارة عن جسم مضاد متوافق مع البشر humanized.

٦- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يكون الجسم المضاد عبارة عن جسم مضاد خيمري chimeric antibody.

٧- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يكون الجسم المضاد عبارة عن جسم مضاد مكسو veneered antibody.

٨- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة ويكون عبارة عن شظية Fab fragment، أو سلسلة مفردة single chain Fv.

٩- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة، حيث يكون النمط المتماثل isotype عبارة عن IgG1 بشري.

١٠- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية السابقة يتضمن طافرة mutation واحدة على الأقل في المنطقة الثابتة.

١١- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٠، حيث تعمل الطافرة mutation على تقليل التثبيت المتمم complement fixation أو التنشيط activation بواسطة المنطقة الثابتة.

١٢- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١١ به طافرة mutation عند واحد أو أكثر من المواضع ٢٤١، ٢٦٤، ٢٦٥، ٢٧٠، ٢٩٦، ٢٩٧، ٣٢٢، ٣٢٩ و ٣٣١ بواسطة ترقيم EU.

١٣- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٢ يتضمن ألانين alanine عند المواضع ٣١٨، ٣٢٠ و ٣٢٢.

١٤- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية ١-٨، حيث يكون النمط المتماثل عبارة عن لـ IgG2 بشري أو نمط متماثل IgG4.

١٥- جسم مضاد antibody يشتمل على منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة heavy chain variable region ناضجةبها متوالية حمض أميني amino acid sequence متطابقة بنسبة ٩٠٪ مع

H4 (متوالية رقم: ١٧) ومنطقة متغيرة خفيفة السلسلة light chain variable region ناضجة بها متوالية حمض أميني متطابقة بنسبة ٩٠٪ مع L3 (متوالية رقم: ٣١)، حيث يرتبط الجسم المضاد antibody على وجه التحديد بألفا سينوكلين بشري human alpha synuclein.

١٦- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٥، يشتمل على ثلاث Kabat CDRs لمتوالية رقم: ٩ وثلاث Kabat CDRs لمتوالية رقم: ٢٤).

١٧- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٦، حيث يتم شغل واحد على الأقل من المواضع H11، H27، H30، H48، وH73 بواسطة L، Y، T، I، وK، على التوالي، ويتم شغل واحد على الأقل من المواضع L12 وL14 بواسطة S.

١٨- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٧، حيث يتم شغل المواضع H11، H27، H30، H48، وH73 بواسطة L، Y، T، I، وK، على التوالي، ويتم شغل المواضع L12 وL14 بواسطة S.

١٩- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية ١٦ إلى ١٨، حيث يتم شغل واحد على الأقل من المواضع H67، H69، وH94 بواسطة A، L، وS، على التوالي.

٢٠- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٩، حيث يتم شغل المواضع H67، H69، وH94 بواسطة A، L، وS، على التوالي.

٢١- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٩، يتم شغل الموضع H94 بواسطة S.

٢٢- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية ٦ إلى ١٨، حيث يتم شغل واحد على الأقل من المواضع L2، L49، وL87 بواسطة V، N، وF، على التوالي.

٢٣- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ٢٢، حيث يتم شغل المواضع L2، L49، و L87 بواسطة فاناديوم V، نيتروجين N، وفلورين F، على التوالي.

٢٤- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية ١٥ إلى ٢٣، يشتمل على منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة heavy chain variable region ناضجة بها متوالية حمض أميني amino acid sequence متطابقة بنسبة ٩٥٪ على الأقل مع H4 (متوالية رقم: ١٧) ومنطقة متغيرة خفيفة السلسلة light chain variable region ناضجة متطابقة بنسبة ٩٥٪ على الأقل مع L3 (متوالية رقم: ٣١).

٢٥- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية ١٥-٢٣، حيث تكون المنطقة المتغيرة ثقيلة السلسلة الناضجة mature heavy chain variable region المدمجة مع منطقة ثابتة ذات سلسلة ثقيلة heavy chain constant region وتكون منطقة متغيرة ذات سلسلة خفيفة ناضجة mature light chain variable region مدمجة مع منطقة ثابتة خفيفة السلسلة.

٢٦- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ٢٥، حيث تكون المنطقة الثابتة ثقيلة السلسلة عبارة عن صورة طافرة mutation لمنطقة ثابتة ثقيلة السلسلة بشرية طبيعية natural human heavy chain والتي يكون لها ارتباط منخفض بمستقبل Fcγ بالنسبة للمنطقة الثابتة ثقيلة السلسلة البشرية الطبيعية.

٢٧- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ٢٥ أو ٢٦، حيث تكون المنطقة الثابتة ثقيلة السلسلة heavy chain constant region عبارة عن نمط متماثل IgG1.

٢٨- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ٢٥، حيث تكون المنطقة المتغيرة ثقيلة السلسلة الناضجة mature heavy chain variable region مدمجة مع منطقة ثابتة ذات سلسلة ثقيلة heavy chain constant region لها تسلسل متوالية رقم: ٣٨ و/ أو تكون منطقة

متغيرة ذات سلسلة خفيفة ناضجة mature light chain variable region مدمجة مع منطقة ثابتة خفيفة السلسلة light chain constant region لها تسلسل متوالية رقم: ٣١).

٢٩- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية ١٥ و١٧-٢٥، توجد أي اختلافات في CDRs للمنطقة المتغيرة ذات السلسلة الثقيلة الناضجة mature heavy chain variable region والمنطقة المتغيرة ذات السلسلة الخفيفة الناضجة mature light chain variable region من H4 و L3 (متواليات أرقام: ١٧ و ٣١، على التوالي) في المواضع H60-H65.

٣٠- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٥، حيث تتضمن منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة heavy chain variable region ناضجة متوالية حمض أميني amino acid sequence تسمى H4 (متوالية رقم: ١٧) وتتضمن منطقة متغيرة ذات سلسلة خفيفة ناضجة mature light chain variable region متوالية حمض أميني تسمى L3 (متوالية رقم: ٣١).

٣١- الجسم المضاد antibody وفقاً لعنصر الحماية ١٥، حيث تتضمن منطقة متغيرة ثقيلة السلسلة heavy chain variable region ناضجة متوالية حمض أميني amino acid sequence تسمى H5 (متوالية رقم: ١٨) وتتضمن منطقة متغيرة ذات سلسلة خفيفة ناضجة mature light chain variable region متوالية حمض أميني تسمى L3 (متوالية رقم: ٣١).

٣٢- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية ١-٣١، حيث يكون الجسم المضاد عبارة عن شظية Fab fragment.

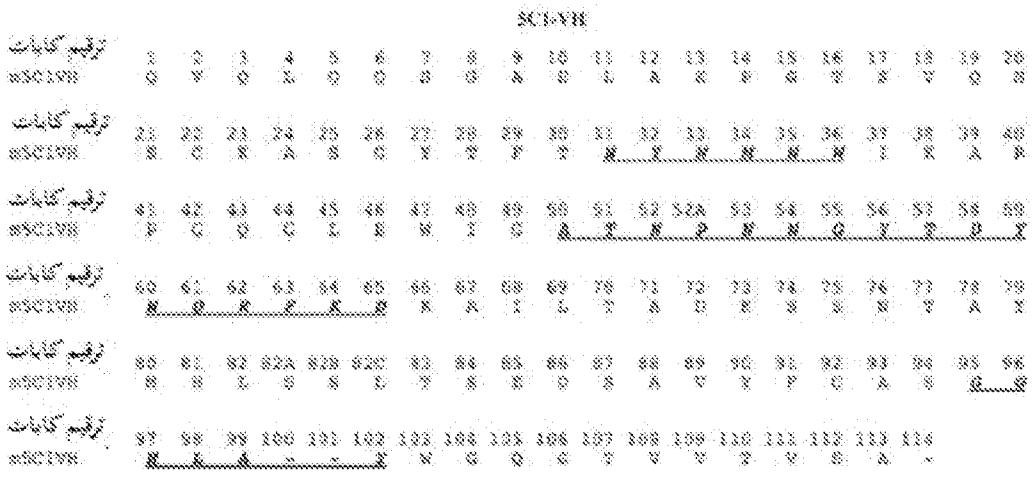
٣٣- الجسم المضاد antibody وفقاً لأي من عناصر الحماية ١-٣١، حيث يكون الجسم المضاد نقية بنسبة ٩٥٪ وزن/ وزن.

٣٤- تركيبة صيدلانية تشتمل على جسم مضاد antibody كما تم التحديد في أي من عناصر الحماية ١-٣٣ ومادة حاملة مقبولة صيدلانياً pharmaceutically-acceptable carrier.

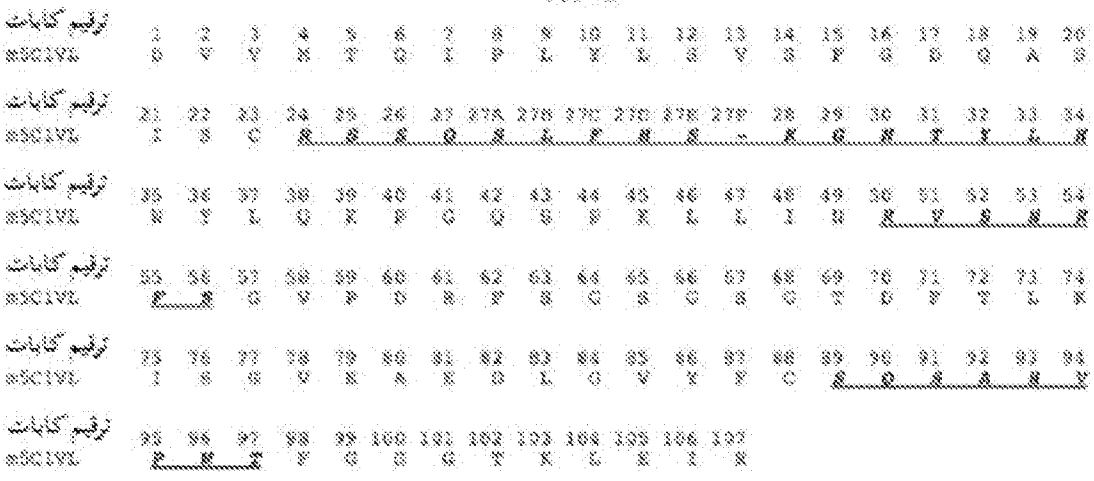
٣٥- حمض نووي nucleic acid مُشفر السلسلة (السلاسل) الثقيلة nucleic acid encoding heavy و/ أو الخفيفة للجسم المضاد كما تم الوصف في أي من عناصر الحماية ١٥-٣٢

٣٦- ناقل تعبير وراثي expression vector ناتج عن عودة الارتباط الجيني recombinant يشتمل على حمض نووي nucleic acid وفقاً لعنصر الحماية ٣٥.

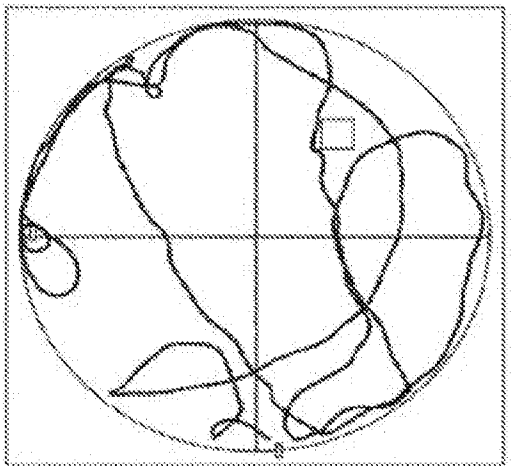
٣٧- خلية عائلة متحولة host cell transformed باستخدام ناقل التعبير الوراثي expression vector الناتج عن عودة الارتباط الجيني recombinant وفقاً لعنصر الحماية ٣٦.

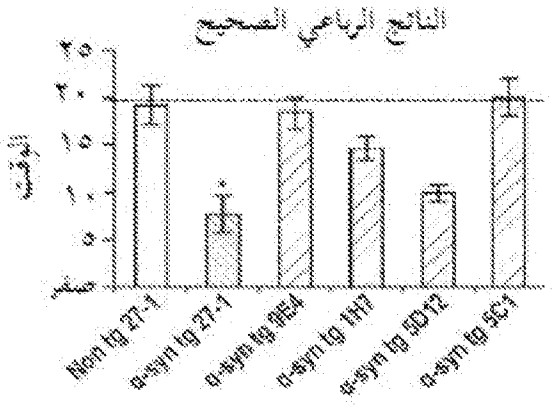


شكل ١

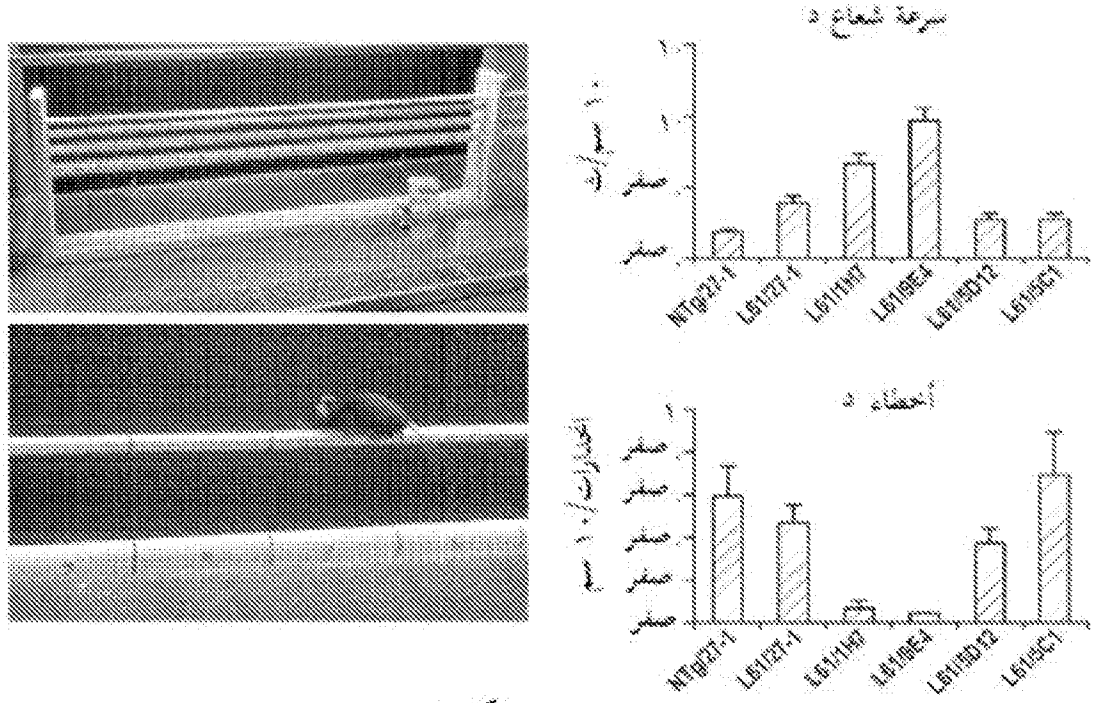


شکل ۲

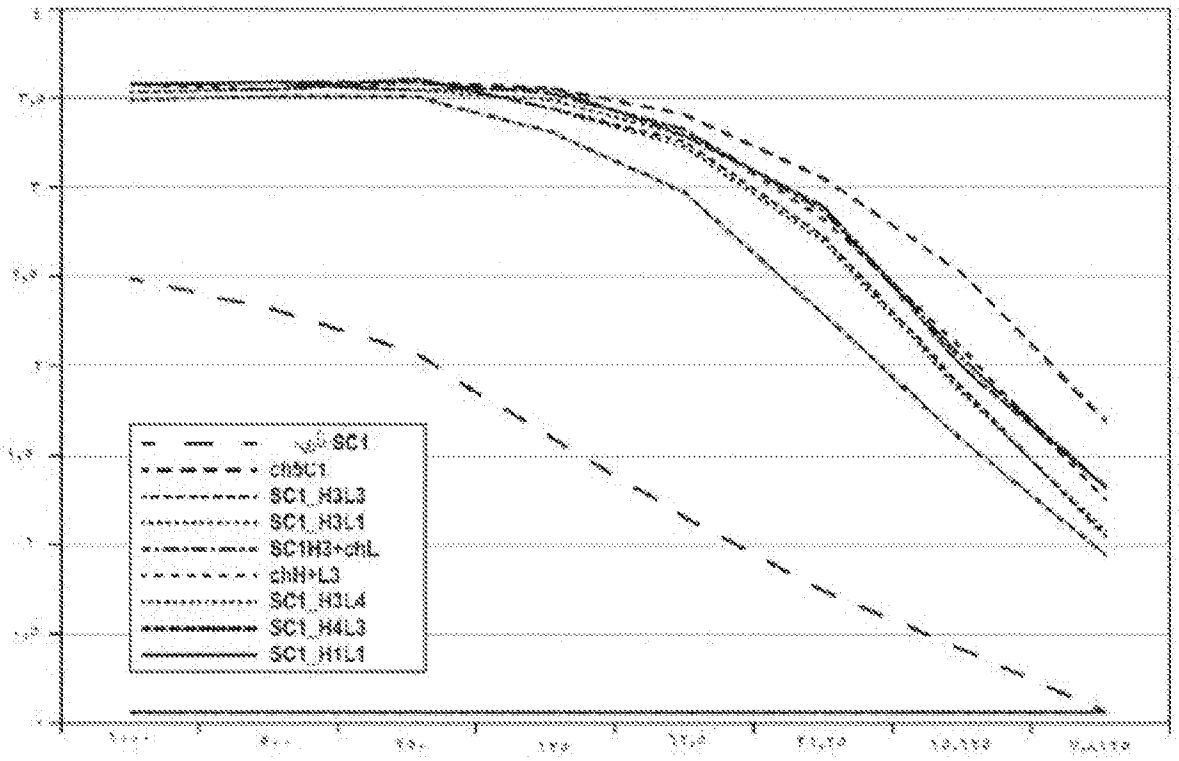



الناتج الرياضي الصحيح
٢٥
٢٠
١٥
١٠
٥
صفر
Non tg 27-1
α-syn tg 27-1
α-syn tg PECA
α-syn tg 1H7
α-syn tg 5D12
α-syn tg 5C1

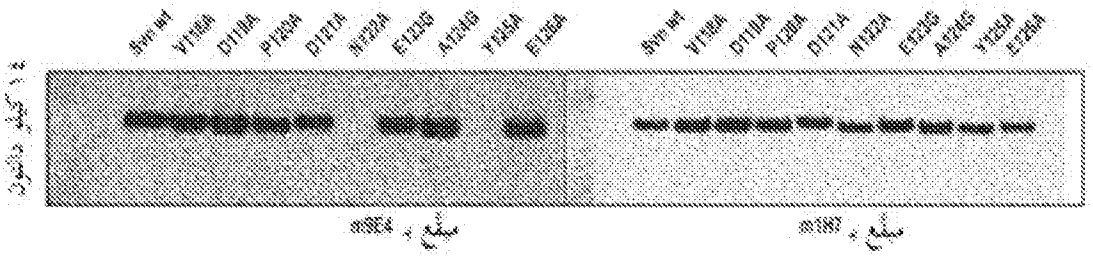
شكل ٣

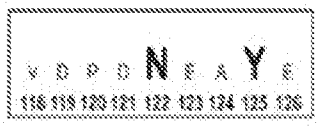


شكل ٤

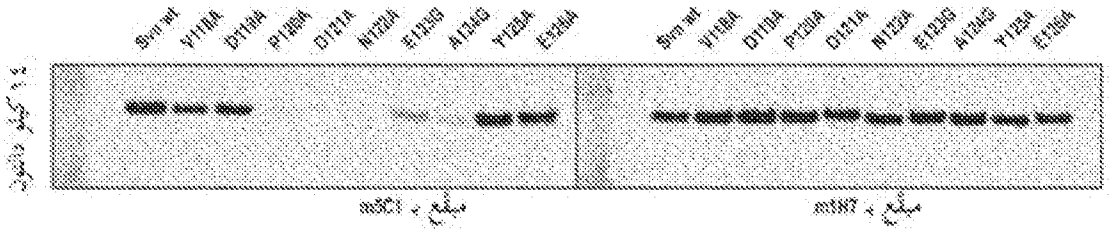

SC1
chSC1
SC1_H3L3
SC1_H3L1
SC1H3+chL
chH+L3
SC1_H3L4
SC1_H4L3
SC1_H1L1

شکل ۵


Swiv wt
V116A
D119A
P120A
D121A
N122A
E123Q
A124G
Y125A
E126A
١٤ كيلو دالتون
m167 مبلغ ،
m824 مبلغ ،

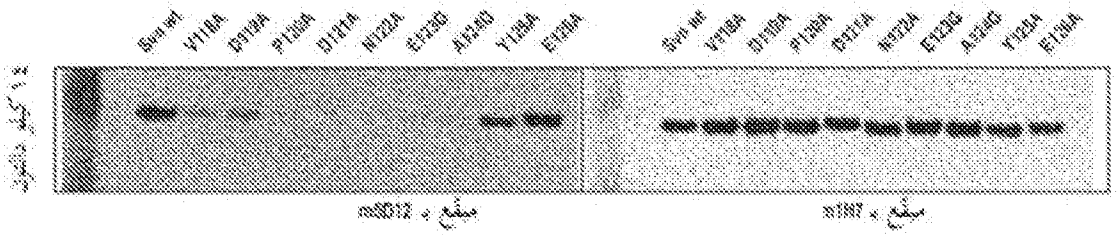

V D P D N E A Y E
116 119 120 121 122 123 124 125 126
السلسلة الثقيلة 824

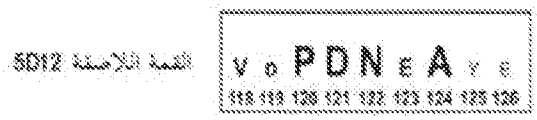
شكل ٦


Sco wt
Y110A
D116A
P120A
D121A
N122A
E124G
A134G
Y135A
E136A
Sco wt
Y110A
D116A
P120A
D121A
N122A
E124G
A134G
Y135A
E136A
٢٤ كيلو دالتون
مبلغ ب mSC1
مبلغ ب mSK7

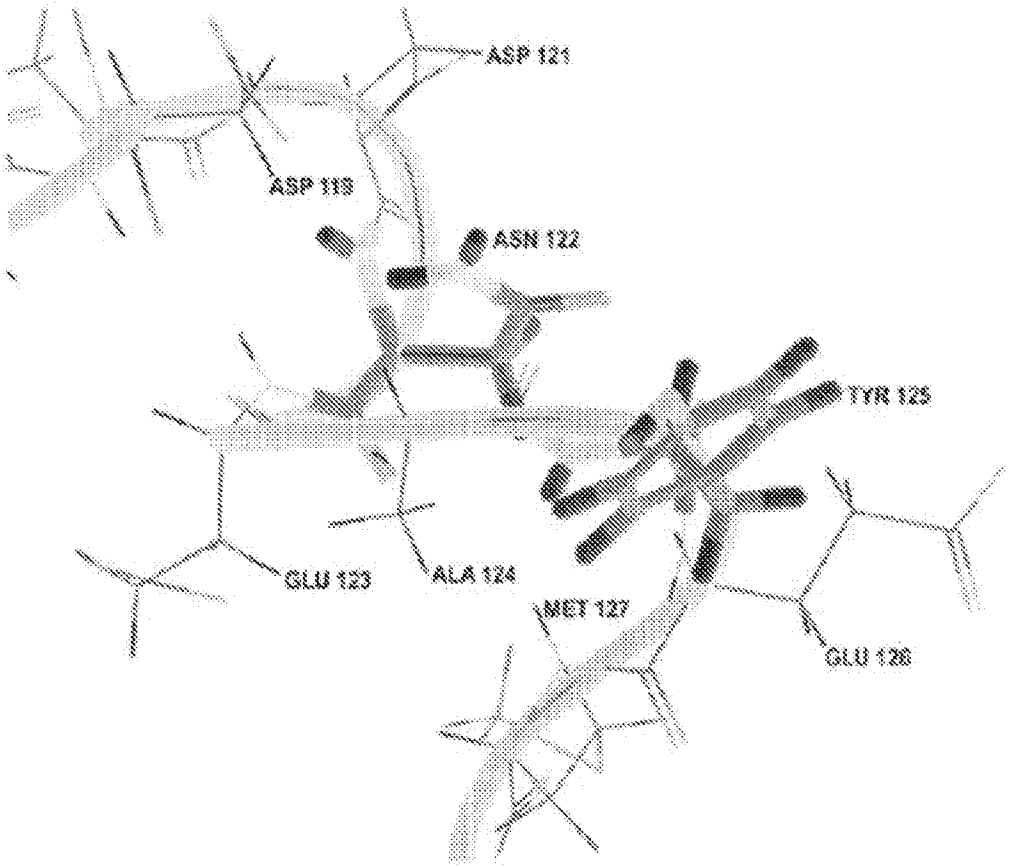
الحمضة اللاصقة SC1
٧ D P D N E A ٢ E
118 119 120 121 122 123 124 125 126

شكل ٧


Syn wt
V116A
D119A
P120A
D121A
W122A
E123G
A124G
T125A
E126A
Syn wt
V116A
D119A
P120A
D121A
W122A
E123G
A124G
T125A
E126A
١٢ كيلو دالتون
مِلْع ، m5D12
مِلْع ، m1N7


الضد الأساسة 5D12
V o P D N E A Y E
116 119 120 121 122 123 124 125 126

شكل ٨



شكل ٩

مدة سريان هذه البراءة عشرون سنة من تاريخ إيداع الطلب

وذلك بشرط تسديد المقابل المالي السنوي للبراءة وعدم بطلانها أو سقوطها لمخالفتها لأي من أحكام نظام براءات الاختراع والتصميمات التخطيطية للدارات المتكاملة والأصناف النباتية والنماذج الصناعية أو لائحته التنفيذية

صادرة عن
مدينة الملك عبدالعزيز للعلوم والتقنية ، مكتب البراءات السعودي
ص ب ٦٠٨٦ ، الرياض ١١٤٤٢ ، المملكة العربية السعودية
بريد الكتروني: patents@kacst.edu.sa