



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

(19) Cộng hòa xã hội chủ nghĩa Việt Nam (VN) (11)
CỤC SỞ HỮU TRÍ TUỆ



1-0028373

(51)^{2020.01} C12N 15/13; C07K 16/28; C12N 15/11; (13) B
C12N 5/16; C12N 15/63; C12N 15/64;
C12N 15/85; A61K 39/00

(21) 1-2015-02798

(22) 05/11/2004

(62) 1-2006-00865

(86) PCT/IB2004/003896 05/11/2004

(87) WO/2005/044859 19/05/2005

(30) 60/517,096 05/11/2003 US

(45) 25/05/2021 398

(43) 26/02/2007 227A

(73) ROCHE GLYCART AG (CH)

Wagistrasse 18, CH-8952 Schlieren-Zurich (CH)

(72) UMANA, Pablo (CR); BRUNKER, Peter (DE); FERRARA, Claudia (CH); SUTER, Tobias (CH); PUNTENER, Ursula (CH); MOSSNER, Ekkehard (DE).

(74) Công ty Cổ phần Hỗ trợ phát triển công nghệ Detech (DETECH)

(54) POLYNUCLEOTIT PHÂN LẬP, CHẾ PHẨM, VẬT TRUYỀN BIỂU HIỆN VÀ TẾ BÀO CHỦ NUÔI CÂY IN VITRO CHỨA POLYNUCLEOTIT PHÂN LẬP

(57) Sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập, chế phẩm, vật truyền biểu hiện và tế bào chủ nuôi cấy in vitro chứa polynucleotit phân lập. Polynucleotit phân lập theo sáng chế chứa:

a) trình tự mã hóa polypeptit có trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO:40; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:56; và SEQ ID NO:60; và

b) trình tự mã hóa polypeptit có trình tự của SEQ ID NO:76.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên (ABM). Theo các phương án đặc biệt, sáng chế đề cập đến các kháng thể tái tổ hợp đơn dòng, bao gồm các kháng thể dạng khảm, động vật linh trưởng hoặc nhân tính hoá đặc hiệu đối với CD20 ở người. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến các phân tử axit nucleic mã hoá các ABM này, và các vật truyền và các tế bào chủ chứa các phân tử axit nucleic đó. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp để tạo ra các ABM theo sáng chế, và đến các phương pháp sử dụng các ABM này để điều trị bệnh. Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các ABM với quá trình glycozyl hoá cải biến có các đặc tính điều trị được cải thiện, bao gồm các kháng thể có gắn kết thụ thể Fc tăng và chức năng tác động tăng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Hệ miễn dịch và kháng thể kháng CD20

Hệ miễn dịch của động vật có xương sống, kể cả người, gồm có một số cơ quan và các nhóm tế bào, tạo ra sự nhận biết, gắn kết và phá huỷ các vi sinh vật lạ xâm chiếm một cách chính xác và cụ thể ("các kháng thể"). Các lympho bào là ác tính đối với chức năng chính của hệ miễn dịch. Các tế bào này được tạo ra trong tủy tủy ức, lách và xương (trưởng thành) và chiếm khoảng 30% tổng các tế bào máu trắng có mặt trong hệ tuần hoàn của người trưởng thành. Có hai quần thể phụ lympho bào chính: các tế bào T và các tế bào B. Các tế bào T có thể đáp ứng đối với tính miễn dịch do tế bào gây ra, trong khi các tế bào B có thể đáp ứng đối với quá trình tạo ra kháng thể (tính miễn dịch thể dịch). Tuy nhiên, trong đáp ứng miễn dịch thông thường, chức năng của các tế bào T và tế bào B phụ thuộc lẫn nhau: các tế bào T được hoạt hoá nếu thụ thể tế bào T gắn kết với các phần của kháng thể được liên kết

với các glycoprotein phức hệ phù hợp tổ chức chính ("MHC") trên bề mặt của tế bào có trong kháng thể; quá trình hoạt hoá này tạo ra sự giải phóng các chất trung gian sinh học ("các intolokin"), các chất này kích thích các tế bào B biệt hoá và tạo ra các kháng thể ("các globulin miễn dịch") chống lại kháng nguyên.

Mỗi tế bào B trong vật chủ biểu hiện kháng thể của một loại đặc biệt và tính đặc hiệu, các tế bào B khác nhau biểu hiện các kháng thể đặc hiệu đối với các kháng nguyên khác nhau. Quá trình tăng sinh tế bào B và quá trình tạo ra kháng thể làm mất tác dụng do phản ứng với kháng nguyên lạ, và cả hai thường ngừng (hoặc về cơ bản giảm) khi kháng nguyên lạ được trung hoà. Tuy nhiên, đôi khi quá trình tăng sinh của tế bào B đặc biệt sẽ tiếp tục không yếu đi; quá trình tăng sinh này có thể gây ra ung thư có liên quan đến "u lympho tế bào B".

Cả hai loại tế bào T và tế bào B đều chứa các protein bề mặt tế bào có thể được sử dụng làm "các gen đánh dấu" để biệt hoá và nhận dạng. Một loại gen đánh dấu tế bào B ở người này là kháng nguyên biệt hoá giới hạn lympho bào Bp35, được đề cập đến là "CD20". CD20 được biểu hiện trong quá trình phát triển tiền tế bào sớm và còn lại cho tới quá trình biệt hoá tế bào plasma. Đặc biệt, phân tử CD20 có thể điều chỉnh bước trong quy trình hoạt hoá cần thiết cho quá trình khởi đầu và biệt hoạt của chu trình tế bào và thường được biểu hiện ở các mức rất cao đối với các tế bào ung thư B ("u"). Vì CD20 có mặt ở các mức cao đối với các tế bào "ung thư" B, nghĩa là, các tế bào B mà quá trình tăng sinh không suy giảm của nó có thể tạo ra u lympho tế bào B, kháng nguyên bề mặt CD20 có khả năng sử dụng làm đích để nhắm đích đến các u lympho tế bào B.

Về thực chất, quá trình nhắm đích này có thể khái quát hoá như sau: các kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên bề mặt CD20 của các tế bào B được đưa vào người bệnh, bằng cách tiêm truyền chẳng hạn. Các kháng thể kháng CD20 này gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt tế bào CD20 của (bề ngoài) cả các tế bào bình thường và các tế bào ác tính B; kháng thể kháng CD20 gắn kết với kháng

nguyên bề mặt CD20 tiêu diệt và làm suy kiệt các tế bào khối u. Ngoài ra, các chất hoá học hoặc các chất đánh dấu phóng xạ có khả năng phá huỷ khối u có thể được kết hợp với kháng thể kháng CD20 sao cho chất này được “phân phối” đặc biệt tới, ví dụ các tế bào khối u B. Bất kể phương pháp nào, mục tiêu quan trọng nhất là phá huỷ khối u: phương pháp đặc hiệu có thể được xác định bởi kháng thể kháng CD20 đặc biệt được sử dụng và vì vậy các phương pháp có thể sử dụng được tiếp cận đích kháng nguyên CD20 có thể thay đổi nhiều.

Các kháng thể đơn dòng không liên kết (mAb) có thể được sử dụng để điều trị bệnh ung thư, như được giải thích bởi U.S. Food and Drug Administration's approval of Rituximab (RituxanTM; IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, and Genentech Inc., San Francisco, CA), để điều trị u lympho không Hodgkin có nang hoặc loại thấp, tế bào B dương tính CD20, Trastuzumab (HerceptinTM; Genentech Inc.) để điều trị ung thư vú sớm (Grillo-Lopez, A.-J., et al., Semin. Oncol. 26:66-73 (1999); Goldenberg, M. M., Clin. Ther. 21:309-18 (1999)), Gemtuzumab (MylotargTM, Celltech/ Wyeth-Ayerst), để điều trị bệnh bạch cầu tuỷ xương cấp tính tái phát, và Alemtuzumab (CAMPATHTM, Millenium Pharmaceuticals/Schering AG) để điều trị bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính tế bào B. Thành công của các sản phẩm này không chỉ dựa vào hiệu lực của chúng mà còn dựa vào các tính chất an toàn nổi bật của chúng (Grillo-Lopez, A.-J., et al., Semin. Oncol. 26: 66-73 (1999); Goldenberg, M.M., Clin. Ther. 21:309-18(1999)). Bất kể các kết quả đã đạt được của các thuốc này, hiện nay vẫn có sự quan tâm lớn để thu được hoạt tính của kháng thể đặc hiệu cao hơn hoạt tính thường được cung cấp bằng phương pháp điều trị không kết hợp mAb. Kháng thể đơn dòng ở chuột, B-Ly1, là kháng thể khác đặc hiệu đã biết đối với CD20 của người (Poppema, S. and Visser, L., Biotest Bulletin 3:131-139 (1987)).

Các kết quả của một số nghiên cứu đã gợi ra rằng các cơ chế phụ thuộc-thụ thể-Fc về cơ bản góp phần vào hoạt động của các kháng thể gây độc tế bào chống lại khối u và chứng tỏ rằng kháng thể tốt nhất chống lại các khối u sẽ gắn kết tốt hơn

với các thụ thể hoạt hoá Fc và tối thiểu với đối tác ức chế FcγRIIB. (Clynes, R. A., et al., *Nature Medicine* 6 (4): 443-446 (2000); Kalergis, A. M., and Ravetch, J. V., *J. Exp. Med.* 195 (12): 1653-1659 (June 2002). Ví dụ, các kết quả của ít nhất một nghiên cứu gợi ý rằng đặc biệt thụ thể FcγRIIIa có liên quan chắc chắn đến hiệu lực của phương pháp điều trị bằng kháng thể. (Cartron, G., et al., *Blood* 99 (3): 754-757 (February 2002)). Nghiên cứu này chứng tỏ rằng các bệnh nhân này có đồng hợp tử đối với FcγRIIIa có đáp ứng tốt hơn Rituximab hơn các bệnh nhân có dị hợp tử. Các tác giả kết luận rằng đáp ứng tốt hơn vì gắn kết in vivo tốt hơn của kháng thể với FcγRIIIa, nó tạo ra hoạt tính ADCC tốt hơn chống lại các tế bào u lympho (Cartron, G., et al., *Blood* 99 (3): 754-757 (tháng 2 năm 2002)).

Đã biết các cố gắng khác nhằm vào kháng nguyên bề mặt CD20. Kháng thể đơn dòng chuột (chuột) 1F5 (kháng thể kháng CD20) được tạo ra theo như đề cập bằng cách tiêm truyền trong tĩnh mạch liên tục tới các bệnh nhân có u lympho tế bào B. Các mức rất cao (>2g) 1F5 cần đến như đề cập để làm suy yếu các tế bào khối u tuần hoàn, và các kết quả được mô tả như là "chuyển tiếp" bởi Press et al., "Monoclonal Antibody 1F5 (Anti-CD20) Serotherapy of Human B-Cell Lymphomas." *Blood* 69/2: 584-591 (1987). Vấn đề có thể xảy ra với phương pháp này là các kháng thể đơn dòng không phải người (ví dụ, các kháng thể đơn dòng ở chuột) thường không có chất tác động ở người theo chức năng, nghĩa là, chúng không thể to, ngoài những cái khác, gây ra sự phân giải phụ thuộc bổ sung hoặc làm tan các tế bào đích ở người nhờ tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể hoặc sự thực bào gây ra bởi thụ thể Fc. Ngoài ra, các kháng thể đơn dòng không phải của người có thể được nhận biết bởi vật chủ ở người như protein lạ; vì vậy, việc lặp lại các quá trình tiêm truyền các kháng thể này có thể gây ra sự cảm ứng của các đáp ứng miễn dịch dẫn đến các phản ứng quá mẫn có hại. Đối với các kháng thể đơn dòng từ chuột, nó thường được đề cập tới như là đáp ứng kháng thể kháng chuột ở người (Human Anti-Mouse Antibody), hoặc đáp ứng "HAMA". Ngoài ra, các kháng thể "lạ" có thể

bị tấn công bởi hệ miễn dịch của vật chủ đến mức, trong thực tế, chúng bị trung hoà trước khi chúng đi tới điểm đích của chúng.

Phương pháp khác nhằm cải thiện khả năng của các kháng thể đơn dòng ở chuột để có tác dụng điều trị các rối loạn tế bào B được kết hợp chất đánh dấu phóng xạ hoặc độc tố với kháng thể đến mức chất đánh dấu hoặc độc tố được định vị ở vị trí khối u. Ví dụ, kháng thể 1F5 đề cập ở trên được "đánh dấu" bằng iot-131 ("¹³¹I") và được đánh giá theo như đề cập đối với sự phân bố sinh học ở hai bệnh nhân. Xem tài liệu Eary, J. F. et al., "Imaging and Treatment of B-Cell Lymphoma" J. Nuc. Med. 31/8: 1257-1268 (1990); cũng xem tài liệu, Press, O. W. et al., "Treatment of Refractory Non-Hodgkin's Lymphoma with Radiolabeled MB-1 (Anti-CD37) Antibody" J. Clin. Onc. 7/8: 1027-1038 (1989) (chứng tỏ rằng một người bệnh điều trị bằng IF-5 đánh dấu bằng ¹³¹I đã đạt được "đáp ứng không hoàn chỉnh"); Goldenberg, D. M. et al., "Targeting, Dosimetry and Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphomas with Iodine-131-Labeled LL2 Monoclonal Antibody" Clin. Onc. 9/4: 548-564 (1991) (ba trong số tám người bệnh tiêm truyền nhiều lần được đề cập có phát triển đáp ứng HAMA); Appelbaum, F. R. "Radiolabeled Monoclonal Antibodies in the Treatment of Non-Hodgkin's Lymphoma" Hem./Onc. Clinics of N. A. 5/5: 1013-1025 (1991) (review article); Press, O. W. et al "Radiolabeled-Antibody Therapy of B-Cell Lymphoma with Autologous Bone Marrow Support" New England J. Med. 329/17: 1219-12223 (1993) (kháng thể kháng CD20 IF5 được đánh dấu bằng iot-131 và B1); và Kaminski, M. G. et al "Radioimmunotherapy of B-Cell Lymphoma with ¹³¹I Anti-B1 (Anti-CD20) Antibody" New England J. Med. 329/7 (1993) (kháng thể kháng CD20 B1 được đánh dấu bằng iot-131; sau đây là "Kaminski"). Các độc tố (nghĩa là, các tác nhân điều trị bằng hoá chất như doxorubicin hoặc mitomycin C) cũng được kết hợp với các kháng thể. Ví dụ, xem công bố đơn PCT số WO 92/07466 (công bố ngày 14/5/1992).

Các kháng thể dạng khảm chứa các phần kháng thể từ hai hoặc nhiều loài khác nhau (ví dụ chuột và người) được phát triển như là sự lựa chọn để "liên kết" các

kháng thể. Ví dụ, Liu, A. Y. et al, "Production of Mouse-Human Chimeric Monoclonal Antibody to CD20 with Potent Fc-Dependent Biologic Activity" J. Immun. 139/10:3521-3526 (1987), mô tả kháng thể dạng khảm chuột/người trực tiếp chống lại kháng nguyên CD20. Cũng xem, công bố PCT số WO 88/04936. Ví dụ, rituximab (RITUXAN®, kháng thể, kháng CD20 dạng khảm đã được chấp nhận để điều trị u lympho không Hodgkin.

Dựa vào biểu hiện của CD20 bởi các u lympho tế bào B, kháng nguyên này có thể được sử dụng để làm "đích" của u lympho này. Thực chất, đích này có thể được khái quát hoá như sau: các kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên bề mặt CD20 trên các tế bào B được đưa cung cấp cho người bệnh. Các kháng thể kháng CD20 này gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên CD20 của (bề ngoài) cả các tế bào bình thường và các tế bào ác tính B và kháng thể gắn kết với CD20 trên bề mặt tế bào tiêu diệt và làm suy kiệt các tế bào tạo u B. Ngoài ra, các chất hoá học hoặc các chất đánh dấu phóng xạ có thể được gắn trực tiếp hoặc gián tiếp với kháng thể kháng CD20 đến mức tác nhân được "phân phối" chọn lọc tới các tế bào B biểu hiện kháng nguyên CD20. Với cả hai phương pháp này, mục tiêu quan trọng nhất là phá huỷ khối u. Phương pháp đặc hiệu sẽ tùy thuộc vào kháng thể kháng CD20 đặc biệt được sử dụng. Vì vậy, sẽ là hiển nhiên là các phương pháp khác nhau để đạt được kháng nguyên CD20 có thể thay đổi nhiều.

Kháng thể rituximab (RITUXANO) là vùng không đổi dạng khảm chuột với gamma 1 ở người nhờ kỹ thuật di truyền chứa kháng thể đơn dòng trực tiếp chống lại kháng nguyên CD20 ở người. Kháng thể dạng khảm này chứa các vùng không đổi gamma 1 ở người và được nhận biết bằng tên "C2B8" trong patent Mỹ số 5,736, 137 (Andersen et. al.) cấp ngày 17 tháng 4, 1998, cho IDEC Pharmaceuticals Corporation. RITUXAN® được chấp nhận để điều trị cho các bệnh nhân bị tái phát hoặc khức xạ u lympho không Hodgkin tế bào B, dương tính CD20, có nang hoặc loại thấp. Cơ chế của các nghiên cứu hoạt động in vitro chứng tỏ rằng RITUXAN có tính gây độc tế bào phụ thuộc - thể bổ khuyết người (CDC) (Reff et. al, Blood 83 (2):

435-445 (1994)). Ngoài ra, nó có hoạt tính đáng kể trong các thử nghiệm xác định tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). RITUXAN được chứng minh có hoạt tính chống tăng sinh trong các thử nghiệm kết hợp thymidin và có khả năng hạn chế trực tiếp gây chết tế bào, trong khi các kháng thể CD20 thì không (Maloney et al., Blood 88 (10): 637a (1996)).

Glycozyl hoá kháng thể

Thành phần oligosacarit có thể tác động lớn đến các tính chất có liên quan đến hiệu của glycoprotein điều trị bệnh, bao gồm tính ổn định vật lý, kháng lại sự tấn công của proteaza, tương tác với hệ miễn dịch, tính động dược học, và hoạt tính sinh học đặc hiệu. Các tính chất này có thể không chỉ phụ thuộc vào sự có mặt hoặc thiếu, mà còn phụ thuộc vào các cấu trúc đặc hiệu của oligosacarit. Một số khái quát hoá giữa cấu trúc oligosacarit và chức năng glycoprotein có thể được tạo ra. Ví dụ, một số cấu trúc oligosacarit gây ra sự thanh thải nhanh của glycoprotein từ dòng máu nhờ tương tác với các protein gắn kết carbohydrat đặc hiệu, trong khi các cấu trúc khác có thể được gắn kết bằng các kháng thể và khởi động các phản ứng miễn dịch không mong muốn (Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14: 975-81 (1996)).

Các tế bào của động vật có vú là các tế bào chủ được ưu tiên để tạo ra glycoprotein điều trị bệnh, do khả năng glycozyl hoá các protein của chúng trong dạng tương thích nhất để ứng dụng ở người (Cumming et al., Glycobiology 1:115-30 (1991); Jenkins et al., Nature Biotechnol. 14: 975-81 (1996)). Vi khuẩn rất hiếm khi glycozyl hoá các protein, và như các loại vật chủ thông thường khác, như nấm men, nấm dạng sợi, các tế bào côn trùng và thực vật, việc tạo ra các mẫu glycozyl hoá có liên quan đến hệ số thanh thải nhanh khỏi dòng máu, các tương tác miễn dịch không mong muốn, và trong một số trường hợp đặc biệt, làm giảm hoạt tính sinh học. Trong số các tế bào động vật có vú, các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) thường được sử dụng nhất trong hai thập kỷ cuối. Ngoài các mẫu glycozyl hoá thích hợp đã nêu, các tế bào đó cho phép sự hình thành thích hợp của các dòng tế

bào sinh sản vô tính có khả năng phát triển cao, ổn định về mặt di truyền. Chúng có thể được nuôi cấy với các mật độ cao trong các lò phản ứng sinh học đơn giản sử dụng môi trường không chứa huyết thanh, và cho phép triển khai các quy trình sinh học an toàn và có thể tái sản xuất. Các tế bào động vật thường được sử dụng khác bao gồm các tế bào thận chuột đồng mới đẻ (BHK), các tế bào u tuỷ chuột NS0 và SP2/0. Mới đây, quá trình sản xuất từ các động vật chuyển gen cũng được thử nghiệm (Jenkins et al., *Nature Biotechnol.* 14:975-81 (1996)).

Tất cả các kháng thể chứa các cấu trúc carbohydrat ở các vị trí bảo toàn trong các vùng không biến đổi chuỗi nặng, với mỗi kiểu tương đương có sự sắp xếp các cấu trúc carbohydrat liên kết N khác biệt, thay đổi đó tác động tới hoạt tính quần tụ, tiết xuất hoặc chức năng của protein. (Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15: 26-32 (1997)). Cấu trúc của carbohydrat liên kết N gắn vào có thể thay đổi nhiều, tùy thuộc vào mức độ xử lý, và có thể bao gồm mannoza cao, đa nhánh cũng như oligosacarit phức hệ hai râu. (Wright, A., and Morrison, S. L., *Trends Biotech.* 15:26-32 (1997)). Thông thường, có quy trình không tương đồng của các cấu trúc oligosacarit nhân gắn ở vị trí glycozyl hoá đặc biệt đến mức các kháng thể đơn dòng tồn tại dưới dạng đa glyco. Tương tự, đã chứng minh được rằng các khác biệt chính trong quá trình glycozyl hoá kháng thể xuất hiện giữa các dòng tế bào, và thậm chí các khác biệt nhỏ cũng được thấy đối với sự sinh trưởng của dòng tế bào đã nêu trong các điều kiện nuôi cấy khác nhau (Lifely, M. R. et al., *Glycobiology* 5 (8):813-22 (1995)).

Một cách để đạt được mức tăng lớn về tiềm năng, trong khi duy trì quy trình sản xuất đơn giản và tránh một cách hữu hiệu các tác dụng phụ không mong muốn, đáng kể, là tăng cường các chức năng tự nhiên của chất tác động do tế bào gây ra của các kháng thể đơn dòng bằng cách xử lý thành phần oligosacarit như được mô tả trong Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17:176-180 (1999) và patent Mỹ số 6,602,684, tất cả nội dung của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Các kháng thể typ IgG1, các kháng thể thường được nhất trong liệu pháp điều trị ung

thư bằng miễn dịch, là các glycoprotein có vị trí glycozyl hoá liên kết N ở Asn297 trong mỗi vùng CH2. Hai oligosacarit có rêu đôi phức hợp gắn với Asn297 bị giấu giữa các vùng CH2, tạo ra các vùng tiếp xúc mở rộng với khung chính polypeptit, và sự có mặt của chúng là cần thiết đối với kháng thể để tạo ra các chức năng tác động như tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) (Lifely, M. R., et al., *Glycobiology* 5: 813-822 (1995); Jefferis, R., et al., *Immunol Rev.* 163: 59-76 (1998); Wright, A. and Morrison, S. L., *Trends Biotechnol.* 15:26-32 (1997)).

Các tác giả sáng chế trước đó đã cho thấy rằng biểu hiện quá mức ở các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO) chứa $\beta(1,4)$ -N-acetylglucosaminyltransferaza III ("GnTIII"), glycosyltransferaza xúc tác quá trình hình thành các oligosacarit chia đôi, làm tăng đáng kể hoạt tính in vitro ADCC của kháng thể đơn dòng thể khảm kháng u nguyên bào thần kinh (chCE7) được tạo ra bởi các tế bào CHO được xử lý. (Xem Umana, P. et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999); và Công bố đơn quốc tế số WO 99/54342, toàn bộ nội dung của chúng được đưa vào đây bằng cách viện dẫn). Kháng thể chCE7 thuộc loại mAb không kết hợp lớn có tính đặc hiệu và ái lực với khối u lớn, nhưng có quá ít khả năng để sử dụng lâm sàng nếu được tạo ra trong các dòng tế bào công nghiệp chuẩn thiếu enzym GnTIII (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999)). Nghiên cứu này trước tiên để chứng tỏ rằng sự gia tăng hoạt tính ADCC lớn có thể đạt được bằng cách xử lý các tế bào tạo ra bằng kháng thể để biểu hiện GnTIII, nó cũng làm tăng tỷ lệ oligosacarit tách đôi có liên quan đến vùng không đổi (Fc), kể cả oligosacarit không fucosyl hoá, tách đôi, các mức này được thấy ở các kháng thể xuất hiện tự nhiên.

Vẫn cần có các phương pháp điều trị tăng cường nhằm vào kháng nguyên CD20 để điều trị u lympho tế bào B ở động vật linh trưởng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Đã nhận ra khả năng điều trị rất tốt của các phân tử gắn kết kháng nguyên (ABM: antigen-binding molecule) là có tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể B-Lyl và được xử lý bằng glyco để tăng cường ái lực gắn kết thụ thể Fc và chức năng tác động, các tác giả sáng chế đã triển khai phương pháp để tạo ra các ABM này. Ngoài ra, phương pháp này còn bao gồm việc tạo ra các kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp hoặc các đoạn khảm của chúng. Tác dụng của các ABM còn được tăng cường bằng cách xử lý profin quá trình glycozyl hoá của vùng kháng thể Fc.

Vì vậy, theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa: (a) trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO:5, SEQ ID NO:6 và SEQ ID NO:7 (CDRs V_{H-1}); (b) trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO:21, SEQ ID NO:22 và SEQ ID NO:23. (CDRs V_{H-2}); và SEQ ID NO:24. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa SEQ ID NO:8, SEQ ID NO:9 và SEQ ID NO:10. (CDRs V_L). Theo một phương án, polynucleotit bất kỳ trong số các polynucleotit mã hoá polypeptit thể dung hợp.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa SEQ ID No:3. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa SEQ ID No:4. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQ ID No:35; SEQ ID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQ ID No:43; SEQ ID No: 45; SEQ ID No: 47; SEQ ID No:49; SEQ ID No:51; SEQ ID No:53; SEQ ID No: 55; SEQ ID No:57; SEQ ID No:59; SEQ ID No:61; SEQ ID No:63; SEQ ID No:65; SEQ ID No:67; SEQ ID No:69; và SEQ ID No:71. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa SEQ ID No:75. Theo một phương án, các polynucleotit này mã hoá các polypeptit thể dung hợp.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự có độ tương đồng ít nhất là 80% với SEQ ID NO:3, trong đó polynucleotit phân lập này mã hoá

polypeptit thể dung hợp. Theo một khía cạnh nữa, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự có độ tương đồng ít nhất là 80% với SEQ ID NO:4, trong đó polynucleotit phân lập này mã hoá polypeptit thể dung hợp. Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự có độ tương đồng ít nhất là 80% với trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID No:29; SEQ ID No:31; SEQ ID No:33; SEQID No: 35; SEQID No:37; SEQ ID No:39; SEQ ID No:41; SEQID No:43; SEQ ID No:45; SEQ ID No:47; SEQID No:49; SEQID No:51; SEQ ID No:53; SEQ ID No:55; SEQID No:57; SEQ ID No:59; SEQ ID No:61; SEQ ID No:63; SEQ ID No:65; SEQ ID No:67; SEQID No:69; và SEQ ID No:71, trong đó polynucleotit phân lập này mã hoá polypeptit thể dung hợp. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự có độ tương đồng ít nhất là 80% với SEQ ID NO:75, trong đó polynucleotit phân lập mã hoá polypeptit thể dung hợp.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit chứa SEQ ID NO:11 (toàn bộ chuỗi nặng), hoặc đến các polynucleotit có độ tương đồng là 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% với SEQ ID NO:11. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit chứa SEQ ID NO:12 (toàn bộ chuỗi nhẹ), hoặc đến các polynucleotit có độ tương đồng là 80%, 85%, 90%, 95% hoặc 99% với SEQ ID NO:12.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit phân lập mã hoá polypeptit dạng khảm có trình tự SEQ ID No:1. Theo một phương án, polynucleotit chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự SEQ ID No:1; và trình tự mã hoá polypeptit có trình tự của vùng kháng thể Fc, hoặc đoạn của chúng, từ các loài khác chuột. Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit phân lập mã hoá polypeptit dạng khảm có trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQID No:46; SEQ ID No: 48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; và SEQ ID No:72. Theo một phương án,

polynucleotit chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No: 56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; và SEQ ID No:72; và trình tự mã hoá polypeptit có trình tự của vùng kháng thể Fc, hoặc một đoạn của chúng, từ loài khác chuột.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập mã hoá polypeptit dạng khảm có trình tự SEQ ID No:2. Theo một phương án, polynucleotit chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự SEQ ID No:2; và trình tự mã hoá polypeptit có trình tự của vùng kháng thể Fc, hoặc một đoạn của chúng, từ loài khác chuột. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến nucleotit phân lập mã hoá polypeptit dạng khảm có trình tự SEQ ID No:76. Theo một phương án, polynucleotit chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự SEQ ID No:76; và trình tự mã hoá polypeptit có trình tự của vùng kháng thể Fc, hoặc một đoạn của chúng, từ loài khác chuột.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự mã hoá polypeptit có vùng V_H của kháng thể chuột B-Lyl, hoặc các biến thể chức năng của chúng, và trình tự mã hoá polypeptit có trình tự của vùng kháng thể Fc, hoặc một đoạn của chúng, từ loài khác chuột. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự mã hoá polypeptit có vùng V_L của kháng thể chuột B-Lyl, hoặc các biến thể chức năng của chúng, và trình tự mã hoá polypeptit có trình tự của vùng kháng thể Fc, hoặc một đoạn của chúng, từ loài khác chuột.

Sáng chế còn đề cập đến vật truyền biểu hiện chứa polynucleotit phân lập bất kỳ trong số các polynucleotit phân lập mô tả ở trên, và đến tế bào chủ chứa vật truyền biểu hiện này. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa polynucleotit phân lập bất kỳ trong số các polynucleotit phân lập mô tả ở trên.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit phân lập chứa: (a) trình tự được chọn từ nhóm gồm có: SEQ ID NO:15, SEQ ID NO:16 và SEQ ID NO:17 (CDRs V_{H-1}); (b) trình tự được chọn từ nhóm gồm có: SEQ ID NO:25, SEQ ID NO:26 và SEQ ID NO:27 (CDRs V_{H-2}); và SEQ ID NO:28, trong đó polypeptit này là polypeptit thể dung hợp. Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến polypeptit phân lập chứa SEQ ID NO:18, SEQ ID NO:19 và SEQ ID NO:20 (CDRs V_L), trong đó polypeptit này là polypeptit thể dung hợp.

Sáng chế cũng đề cập đến polypeptit dạng khảm chứa trình tự SEQ ID NO:1 hoặc biến thể của chúng. Sáng chế còn đề cập đến polypeptit dạng khảm chứa trình tự SEQ ID NO:2 hoặc biến thể của chúng. Theo một phương án, polypeptit bất kỳ trong số các polypeptit còn chứa vùng Fc người. Sáng chế còn đề cập đến polypeptit dạng khảm chứa trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No: 36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; và SEQ ID No:72, hoặc biến thể của chúng. Sáng chế còn đề cập đến polypeptit dạng khảm chứa trình tự SEQ ID NO:76 hoặc biến thể của chúng. Theo một phương án, polypeptit bất kỳ nào trong số các polypeptit còn chứa vùng Fc người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polypeptit chứa trình tự thu được từ kháng thể chuột B-Ly1 và trình tự thu được từ polypeptit không tương đồng và đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa polypeptit này. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên này là kháng thể. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể là dạng khảm. Theo một phương án được ưu tiên khác nữa, kháng thể hoặc nhân tính hoá hoặc được làm cho có tính của động vật linh trưởng.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polypeptit phân lập chứa SEQ ID NO:13 hoặc biến thể của chúng. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến polypeptit phân lập chứa SEQ ID NO:14.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến ABM, ABM có khả năng cạnh tranh với kháng thể chuột B-Ly1 để gắn kết với CD20 và nó là dạng khảm. Theo một phương án, ABM là kháng thể hoặc một đoạn của chúng. Theo một phương án khác nữa, ABM là kháng thể tái tổ hợp chứa vùng V_H có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO:1; SEQ ID No:30; SEQ ID No:32; SEQ ID No:34; SEQ ID No:36; SEQ ID No:38; SEQ ID No:40; SEQ ID No:42; SEQ ID No:44; SEQ ID No:46; SEQ ID No:48; SEQ ID No:50; SEQ ID No:52; SEQ ID No:54; SEQ ID No:56; SEQ ID No:58; SEQ ID No:60; SEQ ID No:62; SEQ ID No:64; SEQ ID No:66; SEQ ID No:68; SEQ ID No:70; và SEQ ID No:72. Theo một phương án khác, ABM là kháng thể tái tổ hợp chứa vùng V_L có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO:2 và SEQ ID NO:76. Theo một phương án khác, ABM là kháng thể tái tổ hợp được làm cho có tính của động vật linh trưởng. Theo một phương án khác nữa, ABM là kháng thể tái tổ hợp được nhân tính hoá. Theo một phương án khác, ABM là kháng thể tái tổ hợp chứa vùng Fc người. Theo một phương án khác, ABM bất kỳ trong số ABM thảo luận ở trên có thể được kết hợp với gốc như toxin hoặc dấu đồng vị phóng xạ.

Sáng chế còn đề cập đến ABM theo sáng chế, ABM này có các oligosacarit cải biến. Theo một phương án, các oligosacarit cải biến làm giảm quá trình fucosyl hoá khi so với các oligosacarit không cải biến. Theo các phương án khác, oligosacarit cải biến là thể lai hoặc phức hợp. Theo một phương án khác nữa, ABM có tỷ lệ oligosacarit không được fucosyl hoá hoặc oligosacarit không được fucosyl hoá, chia đôi tăng ở vùng Fc chứa phân tử này. Theo một phương án khác, oligosacarit không được fucosyl hoá, chia đôi là thể lai. Theo một phương án khác, oligosacarit không được fucosyl hoá, chia đôi là phức hợp. Theo một phương án

khác, ít nhất 20% oligosacarit ở vùng Fc của polypeptit này không được fucosyl hoá hoặc không được fucosyl hoá, chia đôi. Theo các phương án được ưu tiên, ít nhất 30%, 35%, 40%, 45%, 50%, 55%, 60%, 65%, 70% hoặc 75% hoặc nhiều hơn oligosacarit không được fucosyl hoá, hoặc chia đôi, không được fucosyl hoá.

Sáng chế còn đề cập đến polynucleotit mã hoá ABM bất kỳ trong số ABM nêu trên, và đến các vật truyền biểu hiện và các tế bào chứa polynucleotit này.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp tạo ra ABM, ABM có khả năng cạnh tranh với kháng thể chuột B-Ly1 để gắn kết với CD20 và trong đó ABM này là dạng khảm; phương pháp này bao gồm: (a) nuôi cấy tế bào chủ chứa polynucleotit mã hoá ABM theo sáng chế trong môi trường dưới các điều kiện cho phép polynucleotit này mã hoá ABM nêu trên biểu hiện; và (b) thu hồi ABM này từ dịch nuôi cấy thu được.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa ABM theo sáng chế. Dược dự tính là dược phẩm này có thể còn chứa chất mang dược dụng, tá dược hoặc hỗn hợp của chúng.

Theo một phía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh có thể điều trị được bằng cách làm suy kiệt tế bào B. Phương pháp này bao gồm cung cấp một lượng điều trị hữu hiệu của ABM theo sáng chế cho người cần điều trị. Theo một phương án được ưu tiên, bệnh này được điều trị bằng cách sử dụng ABM là kháng thể dạng khảm, hoặc một đoạn kháng thể dạng khảm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ được xử lý để biểu hiện ít nhất một axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII với lượng đủ để cải biến oligosacarit ở vùng Fc được tạo ra bởi tế bào chủ, trong đó ABM có khả năng cạnh tranh với kháng thể chuột B-Ly1 để gắn kết với CD20 và trong đó là dạng khảm. Theo một phương án, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit thể dung hợp. Theo một phương án, ABM được tạo ra bởi tế bào chủ là kháng thể hoặc đoạn

kháng thể. Theo một phương án khác, ABM chứa vùng tương đương với vùng Fc của IgG người.

Sáng chế cũng đề cập đến polynucleotit phân lập chứa ít nhất một vùng xác định hỗ trợ của kháng thể chuột B-Ly1, hoặc biến thể hoặc dạng cắt cụt của chúng chứa ít nhất các gốc xác định tính đặc hiệu cho vùng xác định hỗ trợ, trong đó polynucleotit phân lập này mã hoá polypeptit thể dung hợp. Tốt hơn là, các polynucleotit phân lập này mã hoá polypeptit thể dung hợp, polypeptit thể dung hợp này là phân tử gắn kết kháng nguyên. Theo một phương án, polynucleotit chứa ba vùng xác định hỗ trợ của kháng thể chuột B-Ly1, hoặc các biến thể hoặc các dạng cắt cụt của chúng chứa ít nhất các gốc xác định tính đặc hiệu đối với từng vùng trong ba vùng xác định hỗ trợ này. Theo một phương án khác, polynucleotit mã hoá toàn bộ vùng biến đổi của chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể dạng khảm (ví dụ, được nhân tính hoá). Sáng chế còn đề cập đến các polypeptit được mã hoá bởi các polynucleotit này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa ít nhất một vùng xác định hỗ trợ của kháng thể chuột B-Ly1, hoặc biến thể hoặc dạng cắt cụt của chúng chứa ít nhất các gốc xác định tính đặc hiệu đối với vùng xác định hỗ trợ này, và chứa trình tự thu được từ polypeptit không tương đồng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định hỗ trợ của kháng thể chuột B-Ly1, hoặc các biến thể hoặc các dạng cắt cụt của chúng chứa ít nhất các gốc xác định tính đặc hiệu đối với từng vùng trong ba vùng xác định hỗ trợ. Theo một khía cạnh khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa vùng có thể biến đổi của chuỗi kháng thể nặng hoặc nhẹ. Theo một phương án sử dụng đặc biệt, phân tử gắn kết kháng nguyên là dạng khảm, ví dụ kháng thể, được nhân tính hoá. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên này, và việc sử dụng phân tử này để điều trị bệnh, bao gồm u lympho tế bào B.

Sáng chế là ví dụ đầu tiên đã biết trong đó kháng thể kháng CD20 Typ II được xử lý để có các chức năng tác động tăng như ADCC, trong khi vẫn giữ được khả năng gây chết tế bào hiệu nghiệm. Vì vậy, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD20 Typ II được xử lý có ADCC tăng do quá trình xử lý này và không mất khả năng quan trọng để gây chết tế bào. Theo một phương án, các kháng thể kháng CD20 Typ II được xử lý để có mẫu biến đổi của quá trình glycozyl hoá ở vùng Fc. Theo một phương án đặc biệt, quá trình glycozyl hoá thay đổi chứa lượng các gốc phức chất chia đôi tăng ở vùng Fc. Theo một phương án đặc biệt, quá trình glycosyl thay đổi chứa mức các gốc fucoza giảm ở vùng Fc. Theo một phương án khác, các kháng thể kháng CD20 Typ II phải trải qua quá trình xử lý polypeptit. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp tạo ra các kháng thể kháng CD20 Typ II và đề cập đến các phương pháp sử dụng các kháng thể này để điều trị các rối loạn tế bào B, kể cả u lympho tế bào B.

Tế bào chủ theo sáng chế có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào NSO, tế bào SP2/01, tế bào u tuỷ YO, tế bào u tuỷ chuột P3X63, tế bào PER, tế bào PER. C6 hoặc tế bào lai. Theo một phương án, tế bào chủ theo sáng chế còn chứa polynucleotit chuyển nhiễm bao gồm polynucleotit mã hoá vùng V_L của kháng thể chuột B-Ly1 hoặc các biến thể của chúng và trình tự mã hoá vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch người. Theo một phương án khác nữa, tế bào chủ theo sáng chế còn chứa polynucleotit chuyển nhiễm bao gồm polynucleotit mã hoá vùng V_H của kháng thể chuột B-Ly1 hoặc các biến thể của chúng và trình tự mã hoá vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ tạo ra ABM có ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và/hoặc chức năng tác động tăng do quá trình cải biến oligosacarit của nó. Theo một phương án, ái lực gắn kết tăng đối với thụ thể Fc, đặc biệt, thụ thể Fc γ RIIIA. Chức năng tác động dự tính ở đây có thể được chọn từ nhóm bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tăng độc tính tế bào do Fc tạo ra; tăng sự

gắn kết với các tế bào NK; tăng sự gắn kết với các tế bào đơn nhân lớn; tăng sự gắn kết với các tế bào nhiều dạng nhân; tăng sự gắn kết với các bạch cầu đơn nhân to; tăng sự truyền tín hiệu trực tiếp gây chết tế bào; tăng quá trình giảm phân tế bào đuôi gai; và tăng sự miễn cảm sơ bộ tế bào.

Theo một phương án khác, tế bào chủ theo sáng chế chứa ít nhất một axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII được liên kết động với thành phần gen khởi đầu cơ định.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra ABM ở tế bào chủ, bao gồm: (a) nuôi cấy tế bào chủ đã được xử lý để biểu hiện ít nhất một polynucleotit mã hoá polypeptit thể dung hợp có hoạt tính GnTIII trong các điều kiện cho phép quá trình tạo ra ABM này và nó cho phép biến đổi sự có mặt của oligosacarit trên vùng Fc của ABM này; và (b) phân lập ABM này; trong đó ABM này có khả năng cạnh tranh với kháng thể chuột B-Ly1 để gắn kết với CD20 và trong đó ABM này là dạng khảm. Theo một phương án, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit thể dung hợp, tốt hơn là chứa vùng xúc tác của GnTIII và vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú tại Golgi không tương đồng được chọn từ nhóm gồm có vùng manosidaza II, vùng định vị $\beta(1,2)$ -N-axetylglucosaminyltransferaza I ("GnTI"), và vùng định vị manosidaza I, vùng định vị $\beta(1,2)$ -N-axetylglucosaminyltransferaza II ("GnTII"), và vùng định vị fucosyltransferaza nhân $\alpha 1-6$. Tốt hơn nếu, vùng định vị Golgi là từ manosidaza II hoặc GnTI.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để cải biến quá trình glycozyl hoá profin của ABM kháng-CD20 được tạo ra bởi tế bào chủ bao gồm đưa vào tế bào chủ ít nhất một axit nucleic hoặc vật truyền biểu hiện theo sáng chế. Theo một phương án, ABM là kháng thể hoặc một đoạn của chúng; tốt hơn là chứa vùng Fc của IgG. Theo cách khác, polypeptit là protein thể dung hợp bao gồm vùng tương đương với Fc của IgG người.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp, hoặc một đoạn của chúng, có khả năng cạnh tranh với kháng thể chuột B-Ly1 để gắn kết với CD20 và có quá trình fucosyl hoá giảm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến phương pháp cải biến quá trình glycozyl hoá kháng thể tái tổ hợp hoặc một đoạn của chúng theo sáng chế nhờ sử dụng polypeptit thể dung hợp có hoạt tính GnTIII và chứa vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú tại Golgi không tương đồng. Theo một phương án, các polypeptit thể dung hợp theo sáng chế chứa vùng xúc tác của GnTIII. Theo một phương án khác, vùng định vị Golgi được chọn từ nhóm gồm có: vùng định vị của manosidaza II, vùng định vị của GnTI, vùng định vị của manosidaza I, vùng định vị của GnTII và vùng định vị của fucosyltransferaza nhân α 1-6. Tốt hơn nếu, vùng định vị Golgi là từ manosidaza II hoặc GnTI.

Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế được đề cập nhằm mục đích tạo ra kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp hoặc một đoạn của chúng, với các oligosacarit cải biến trong đó các oligosacarit cải biến này làm giảm quá trình fucosyl hoá so với các oligosacarit không cải biến. Theo sáng chế, các oligosacarit cải biến có thể là thể lai hoặc phức hợp. Theo phương án khác, phương pháp theo sáng chế được đề cập nhằm mục đích tạo ra kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp hoặc một đoạn của chúng có tỷ lệ các oligosacarit không fucosyl hoá, chia đôi tăng ở vùng Fc của polypeptit này. Theo một phương án, các oligosacarit không fucosyl hoá, chia đôi là thể lai. Theo một phương án, các oligosacarit không fucosyl hoá, chia đôi là phức hợp. Theo một phương án khác nữa, phương pháp theo sáng chế được đề cập nhằm mục đích tạo ra kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp hoặc một đoạn của chúng có ít nhất 20% oligosacarit ở vùng Fc của polypeptit này được chia đôi, không được fucosyl hoá. Theo một phương án được ưu tiên, ít nhất 30% oligosacarit ở vùng Fc của polypeptit này được chia đôi, không được fucosyl hoá. Theo một phương án được ưu tiên khác, trong đó ít nhất 35% oligosacarit ở vùng Fc của polypeptit này được chia đôi, không được fucosyl hoá.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp hoặc một đoạn của chúng, có ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và/hoặc chức năng tác động tăng do quá trình cải biến các oligosacarit của nó. Theo một phương án, ái lực gắn kết tăng đối với thụ thể hoạt hoá Fc. Theo một phương án khác nữa, thụ thể Fc là thụ thể hoạt hoá Fc γ , đặc biệt là thụ thể Fc γ RIIIA. Chức năng tác động dự tính ở đây có thể được chọn từ nhóm gồm có, nhưng không giới hạn ở, tăng độc tính tế bào do Fc gây ra; tăng sự gắn kết với các tế bào NK; tăng sự gắn kết với các tế bào đơn nhân lớn; tăng sự gắn kết với các tế bào nhiều dạng nhân; tăng sự gắn kết với các bạch cầu đơn nhân to; tăng sự truyền tín hiệu trực tiếp gây chết tế bào; tăng quá trình giảm phân tế bào đuôi gai; và tăng sự miễn cảm sơ bộ tế bào.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến một đoạn kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp, có tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể chuột B-Ly1 và chứa vùng Fc, được xử lý để làm tăng chức năng tác động được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến protein thể dung hợp bao gồm polypeptit có trình tự SEQ ID NO:1 và vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch và được xử lý để làm tăng chức năng tác động được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến protein thể dung hợp bao gồm polypeptit có trình tự SEQ ID NO:2 và vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch và được xử lý để làm tăng chức năng tác động được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp, được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, và chất mang dược dụng. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa một đoạn kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp, được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, và chất mang

được dùng. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến được phẩm chứa protein thể dung hợp được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế, và chất mang được dùng.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp để điều trị bệnh có thể điều trị được bằng cách làm suy kiệt tế bào B bao gồm cung cấp cho đối tượng cần điều trị một lượng hữu hiệu của kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp hoặc một đoạn của chúng, được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp theo sáng chế.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO:3) và axit amin (SEQ ID NO:1) của vùng V_H của chuột B-Ly1.

Fig.2. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO:4) và axit amin (SEQ ID NO:2) của vùng V_L của chuột B-Ly1.

Fig.3. Gắn kết Rituximab® (O) và ch-B_Ly1 (Δ) với CD20 trên các tế bào u lympho Raji B.

Fig.4. Làm suy kiệt tế bào B bằng Rituximab® (O) và ch-B_Ly1 (Δ) trong toàn bộ máu chứa ba nhóm khác nhau của kiểu gen FcγRIIIa-158V/F: (A) toàn bộ máu từ thể cho F/F, đồng hợp tử đối với thụ thể ái lực thấp; (B) toàn bộ máu từ thể cho F/V, đồng hợp tử đối với thụ thể ái lực; và (C) toàn bộ máu từ thể cho V/V, đồng hợp tử đối với thụ thể ái lực cao hơn.

Fig.5. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO:11) và axit amin (SEQ ID NO:13) chứa chuỗi nặng của kháng thể kháng CD20, dạng khảm.

Fig.6. Trình tự nucleotit (SEQ ID NO:12) và axit amin (SEQ ID NO:14) chứa chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD20, dạng khảm.

Fig.7. Trình tự nucleotit và axit amin của kháng thể chuột B-Ly1 CDRs. (A) CDRs dự đoán đối với vùng V_H . (B) CDRs dự đoán đối với vùng V_L .

Fig.8. Profin MALDI-TOF của kháng thể B-Lyl dạng khảm, xử lý glyco. (A) Bảng chi tiết các phân đỉnh đặc hiệu; (B) Phổ B-Lyl dạng khảm xử lý glyco; (C) Phổ đối với B-Lyl dạng khảm xử lý glyco xử lý bằng Endo-H.

Fig.9. Gắn kết các kháng thể kháng CD20 được nhân tính hoá khác biệt với các tế bào Raji B. Sự biệt hoá giữa cấu trúc B-HH2 và các cấu trúc B-HL8 và B-HL11 định vị trong các vùng khung 1 và 2 với tất cả ba CDRs là đồng nhất. B-HL8 và B-HL11 có các trình tự FR1 và FR2 của chúng thu được từ nhóm VH3 người, trong khi khung B-HH2 hoàn chỉnh thu được từ VH1 người. B-HL11 là dẫn xuất của B-HL8 có sự đột biến đơn Glu/Gln, với Gln là gốc axit amin trong cấu trúc B-HH2. Điều này có nghĩa là sự trao đổi Glu/Gln không làm thay đổi ái lực hoặc cường độ gắn kết. Các khác biệt khác giữa B-HH2 và B-HL8 là các gốc 14 FR, từ đó một hoặc nhiều khác biệt sẽ tác động đến tập tính gắn kết kháng nguyên của kháng thể này.

Fig.10. Gắn kết kháng thể kháng CD20 BHL4-KV1 trên các tế bào đích Raji. Cấu trúc B-HL4 thu được từ kháng thể B-HH2 bằng cách thay thế FR1 của B-HH2 bằng của trình tự dòng phôi người VH1_45. Cấu trúc này chứng tỏ khả năng gắn kết kháng nguyên giảm bớt đáng kể, mặc dù chỉ có các axit amin khác biệt ở ba vị trí trong FR1. Các gốc này định vị ở các vị trí 2, 14, và 30 theo cách đánh số Kabat. Trong các vị trí này, vị trí 30 dường như là vị trí có ảnh hưởng nhất, vì nó là một phần của sự xác định Chothia của CDR1.

Fig.11. So sánh tập tính gắn kết giữa B-HH1, B-HH2, B-HH3, và kháng thể gốc B-lyl. Thông số này chứng tỏ rằng tất cả Abs có giá trị EC_{50} tương tự, nhưng cấu trúc B-HH1 gắn kết với cường độ/hệ số tỷ lệ thấp hơn các biến thể B-HH2 và B-HH3. B-HH1 có thể phân biệt được với B-HH2 và B-HH3 nhờ các vùng CDR1 và CDR2 không hoàn chỉnh ở người (định nghĩa Kabat), cũng như dạng đa hình Ala/Thr ở vị trí 28 (cách đánh số Kabat). Điều này chứng tỏ rằng hoặc vị trí 28,

CDR1 hoàn chỉnh, và/hoặc CDR2 hoàn chỉnh là quan trọng đối với sự tương tác kháng thể/kháng nguyên.

Fig.12. So sánh B-HL1, B-HH1, và kháng thể gốc B-lyl. Thông số này chứng tỏ không có hoạt tính gắn kết bất kỳ nào trong cấu trúc B-HL1, và có khoảng một nửa cường độ/hệ số tỷ lệ gắn kết B-HH1 so với B-lyl. Cả B-HL1, cũng như B-HH1, được đưa vào dựa vào các khung thể nhận thu được từ nhóm VH1 người. Trong số các khác biệt, vị trí 71 (cách đánh số Kabat) của cấu trúc B-HL1 là khác biệt gây ấn tượng, chứng tỏ tầm quan trọng được giả định của nó đối với sự gắn kết kháng nguyên.

Fig.13. Phân tích hồng cầu lưới huỳnh quang (fluorocytometric) về khả năng của kháng thể kháng CD20 với kháng nguyên của nó. Thông số này chứng tỏ rằng các cấu trúc B-HL2 và B-HL3 không thể hiện hoạt tính gắn kết CD-20.

Fig.14. Sự gây chết tế bào của các kháng thể kháng CD20 hoặc các tế bào Z-138 MCL.

Fig.15. Sự gây chết tế bào bởi các kháng thể kháng CD20. Thử nghiệm chi tiết: 5×10^5 tế bào/giếng được cấy vào các đĩa 24 giếng (5×10^5 tế bào/ml) trong môi trường nuôi cấy. 10mg Ab, PBS tương ứng đối với đối chứng âm tính hoặc 5mM Camptothecin (CPT) đối chứng dương tính được bổ sung vào các giếng. Các mẫu được ủ o/n (16 giờ), nhuộm bằng AnnV-FITC và phân tích bằng FACS. Thử nghiệm được tiến hành ba lần. (*): tín hiệu đối với riêng PBS bỏ đi (riêng PBS tạo ra 8% và 2% AnnV+ cho các tế bào PR-1 và Z-138 tương ứng). Các kháng thể được sử dụng là: C2B8 (dạng khảm, không xử lý glyco); BHH2-KV1 (được nhân tính hoá, không xử lý glyco). Chú ý: thử nghiệm này không gồm bất kỳ tế bào tác động bổ sung nào, chỉ nhằm các mục tiêu thêm vào kháng thể hoặc các đối chứng.

Fig.16. Giết tế bào-đích bằng các kháng thể kháng CD20 với các tế bào tác động miễn dịch. Thử nghiệm chi tiết: làm suy kiệt tế bào B trong quá trình ủ thông

thường qua đêm toàn bộ máu và phân tích đối với CD19+/CD3+ bằng FACS. ADCC nhờ sử dụng PBMCs làm các chất tác động, quá trình ủ trong 4 giờ, tỷ lệ chất tác động: đích là 25:1, đích-tử vong được xác định bằng Calcein-thẩm tích có liên quan đến chất tẩy rửa-sự phân giải (100%) và đến sự phân giải không có Ab (0%). Các kháng thể được sử dụng: C2B8 (dạng khảm, không xử lý glyco); BHH2-KV1-wt (dạng được nhân tính hoá, không xử lý glyco của BHH2-KV1); BHH2-KV1-GE (dạng nhân tính hoá, xử lý glyco của BHH2-KV1).

Fig.17. profin MALDI/TOF-MS của các Fc-oligosacarit giải phóng nhờ PNGaseF- của kháng thể kháng CD20 của người IgG1 B-lyl được nhân tính hoá bằng BHH2-KV1 không cải biến, không xử lý glyco.

Fig.18. profin MALDI/TOF-MS của các Fc-oligosacarit giải phóng nhờ PNGaseF- của kháng thể kháng CD20 của người IgG1 B-lyl được nhân tính hoá bằng BHH2-KV1 xử lý glyco. Xử lý glyco được thực hiện nhờ đồng biểu hiện ở các tế bào chủ của các gen kháng thể và gen mã hoá enzym bằng hoạt tính xúc tác β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnT-III).

Fig.19. Profin MALDI/TOF-MS của các Fc-oligosacarit giải phóng nhờ PNGaseF- của kháng thể kháng CD20 của người IgG1 B-lyl được nhân tính hoá bằng BHH2-KV1 xử lý glyco. Xử lý glyco được thực hiện nhờ đồng biểu hiện ở các tế bào chủ của các gen kháng thể và gen mã hoá enzym bằng hoạt tính xúc tác β -1,4-N-acetylglucosaminyltransferaza III (GnT-III) và mã hoá enzym bằng hoạt tính xúc tác Golgi α -mannosidaza II.

Fig.20. Gắn kết các kháng thể không xử lý glyco và xử lý glyco với thụ thể FcgammaRIIIa thể hiện trên bề mặt của các tế bào tái tổ hợp CHO- CD16.

Fig.21. Sự tăng sinh quá mức của các kháng thể kháng CD20 không xử lý bằng Fc và xử lý bằng Fc trên các tế bào Z-138 MCL. Thử nghiệm: 5×10^5 tế bào/giếng được cấy vào các đĩa 24 giếng (5×10^5 tế bào/ml) trong môi nuôi cấy. 10mg

Ab, PBS tương ứng cho đối chứng âm tính được thêm vào các giếng. Các mẫu được ủ o/n (16 giờ), nhuộm bằng AnnV-FITC và phân tích bằng FACS. Thử nghiệm được thực hiện ba lần. Abs được sử dụng: C2B8=rituximab (dạng khảm, không xử lý glyco, tương tự như dạng thương phẩm; BHH2-KV1 (được nhân tính hoá, không xử lý glyco-xem Fig.6 đối với profin glycozyl hoá); BHH2-KV1 gl (được nhân tính hoá, xử lý glyco-xem Fig.7 đối với profin glycozyl hoá); BHH2-KV1 g2 (được nhân tính hoá, xử lý glyco-xem Fig.8 đối với profin glycozyl hoá). Chú ý: thử nghiệm này không gồm bất kỳ tế bào tác động bổ sung nào, chỉ nhằm các mục tiêu thêm vào kháng thể hoặc các đối chứng. (*): tín hiệu đối với riêng PBS bỏ đi.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các thuật ngữ được sử dụng ở đây như thường được sử dụng trong phần bản chất kỹ thuật, trừ khi được định nghĩa khác nhau dưới đây.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ kháng thể sẽ bao gồm toàn bộ các phân tử kháng thể, kể cả các kháng thể đơn dòng, đa dòng và đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép), cũng như các đoạn kháng thể có vùng Fc và giữ được tính đặc hiệu liên kết, và các protein thể dung hợp có vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch và giữ được tính đặc hiệu liên kết. Cũng bao gồm cả các kháng thể được nhân tính hoá, được làm cho tính của động vật linh trưởng và dạng khảm.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ vùng Fc sẽ đề cập đến vùng tận cùng C của chuỗi nặng IgG. Mặc dù các đường ranh giới của vùng Fc của chuỗi nặng IgG có thể thay đổi ở mức không đáng kể, vùng Fc của chuỗi nặng IgG ở người thường được xác định là kéo dài từ gốc axit amin ở vị trí Cys226 tới các đầu tận cùng carboxyl.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch sẽ bao gồm các biến thể alen xuất hiện tự nhiên của globulin miễn dịch cũng như các biến thể có các biến đổi tạo ra các thay thế, bổ sung, hoặc làm khuyết đoạn nhưng về cơ bản không làm giảm khả năng của globulin miễn dịch

để tạo ra các chức năng tác động (như tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể). Chẳng hạn, một hoặc nhiều axit amin có thể được làm khuyết đoạn từ các đầu tận cùng N hoặc C của vùng Fc của globulin miễn dịch không mất đáng kể chức năng sinh học. Các biến thể này có thể được chọn lọc theo quy tắc chung đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật đến mức có tác dụng tối thiểu đến hoạt tính (Ví dụ, xem Bowie, J. U. et al., Science 247: 1306-10 (1990)).

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ phân tử gắn kết kháng nguyên trong nghĩa chung nhất của nó đề cập đến phân tử gắn kết đặc hiệu với yếu tố di truyền kháng nguyên. Đặc biệt hơn, phân tử gắn kết kháng nguyên gắn kết CD20 là phân tử gắn kết đặc hiệu với phosphoprotein không glycozyl hoá bề mặt tế bào 35.000 Dalton, thường được chỉ định là kháng nguyên biệt hoá giới hạn lympho bào B ở người Bp35, thông thường là CD20. Bằng cách "gắn kết đặc hiệu" có nghĩa là gắn kết được chọn lọc đối với kháng nguyên và có thể được phân biệt giữa các tương tác không mong muốn hoặc không đặc hiệu.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ thể dung hợp và dạng khả, khi được sử dụng có liên quan đến các polypeptit như các ABM đề cập đến các polypeptit chứa các trình tự axit amin thu được từ hai hoặc nhiều polypeptit không tương đồng, như các phần của các kháng thể từ các loài khác nhau. Đối với các ABM, ví dụ các thành phần gắn kết không kháng nguyên có thể thu được từ rất nhiều loài khác nhau, kể cả động vật linh trưởng như hắc tinh tinh và người. Vùng không đổi của ABM dạng khả tốt nhất về cơ bản đồng dạng với vùng không đổi của kháng thể người tự nhiên; vùng biến đổi của kháng thể dạng khả tốt nhất về cơ bản đồng dạng với vùng biến đổi của kháng thể kháng CD-20 tái tổ hợp có trình tự axit amin của vùng biến đổi chuột B-Lyl. Các kháng thể người là dạng được ưu tiên đặc biệt của kháng thể thể dung hợp hoặc dạng khả.

Như được sử dụng ở đây, polypeptit có "hoạt tính GnSIII" đề cập đến các polypeptit có thể xúc tác quá trình bổ sung gốc N-axetylglucosamin (GlcNAc) trong

liên kết β -1-4 vào manosit liên kết β của nhân trimannosyl của các oligosacarit liên kết N. Các polypeptit này bao gồm các polypeptit thể dung hợp có hoạt tính enzym tương tự với, nhưng không cần thiết giống hệt với, hoạt tính của β (1,4)-N-axetylglucosaminyltransferaza III, còn được biết là β -1,4-mannosyl-glycoprotein 4-beta-N-axetylglucosaminyl-transferaza (EC 2.4. 1.144), theo Nomenclature Committee of the International Union of Biochemistry and Molecular Biology (NC-IUBMB), như được xác định trong thử nghiệm sinh học đặc biệt, có hoặc không phụ thuộc vào liều lượng. Trong trường hợp trong đó sự phụ thuộc vào liều lượng tồn tại, thì không cần giống hệt với liều lượng của GnTIII, nhưng dĩ nhiên về cơ bản tương tự với sự phụ thuộc liều lượng trong hoạt tính đã cho như so với GnTIII (tức là, polypeptit ứng cử sẽ có hoạt tính lớn hơn rất nhiều hoặc không lớn hơn khoảng dưới 25 lần, và tốt hơn nếu, không lớn hơn dưới 10 lần hoạt tính, và tốt nhất nếu, không lớn hơn khoảng dưới ba lần hoạt tính có liên quan đến GnTIII.)

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ thể biến dị (hoặc chất đồng đẳng) đề cập đến polypeptit khác với polypeptit đưa ra riêng biệt theo sáng chế bằng cách xen đoạn, làm khuyết đoạn và thay thế axit amin, tạo ra bằng cách sử dụng, ví dụ các kỹ thuật tái tổ hợp ADN. Các thể biến dị của các ABM theo sáng chế bao gồm các phân tử gắn kết kháng nguyên ở người hoặc động vật linh trưởng, dạng khảm trong đó một hoặc một số trong các gốc axit amin được cải biến bằng cách thay thế, bổ sung và/hoặc làm khuyết đoạn theo cách mà về cơ bản không tác động đến ái lực gắn kết kháng nguyên (ví dụ, CD20). Chỉ dẫn để xác định các gốc axit amin nào có thể được thay thế, bổ sung hoặc làm khuyết đoạn không làm mất các hoạt tính quan tâm, có thể được phát hiện bằng cách so sánh trình tự của polypeptit đặc biệt với trình tự của các peptit tương đồng và làm giảm đến mức tối thiểu số lượng các thay đổi trình tự axit amin được tạo ra ở các vùng có tính tương đồng cao (các vùng bảo toàn) hoặc bằng cách thay thế các axit amin bằng trình tự liên ứng.

Theo cách khác, các thể biến dị tái tổ hợp mã hoá các polypeptit tương tự hoặc như nhau có thể được tổng hợp hoặc chọn lọc bằng cách làm cho việc sử dụng "du

thừa" ở mã di truyền. Các thay thế đơn vị mã khác nhau, như các thay đổi cam tạo ra vị trí giới hạn khác nhau, có thể được đưa vào để tối ưu hoá việc tách dòng vào plasmid hoặc vật truyền virus hoặc biểu hiện ở hệ sinh vật không có nhân điển hình hoặc có nhân điển hình đặc biệt. Quá trình đột biến ở trình tự polynucleotit có thể được phản xạ trong polypeptit hoặc các vùng của các peptit khác được thêm vào polypeptit để cải biến các đặc tính của bất kỳ phần nào của polypeptit, để thay đổi các đặc điểm như ái lực gắn kết phối tử, ái lực trao đổi, hoặc tốc độ thoái biến/tuần hoàn.

Tốt hơn là, "các thay thế" axit amin là kết quả của sự thay thế một axit amin bằng axit amin khác có các tính chất cấu trúc và/hoặc hoá học tương tự, nghĩa là các thay thế axit amin bảo toàn. Các thay thế axit amin "bảo toàn" có thể được tạo ra dựa vào cơ sở giống nhau ở tính phân cực, điện tích, độ tan, tính kỵ nước, tính ưa nước, và/hoặc bản chất lưỡng tính của các gốc liên quan. Ví dụ, các axit amin không phân cực (kỵ nước) bao gồm alanin, leuxin, isoleuxin, valin, prolin, phenylalanin, tryptophan, và metionin; các axit amin phân cực trung tính bao gồm glyxin, serin, threonin, xystein, tyrosin, asparagin, và glutamin; các axit amin tích điện dương (bazo) bao gồm arginin, lysin, và histidin; và các axit amin tích điện âm (axit) bao gồm axit aspartic và axit glutamic. Tốt hơn nếu "việc xen đoạn" hoặc "làm khuyết đoạn" nằm trong khoảng từ 1 đến 20 axit amin, tốt hơn nữa là 1 đến 10 axit amin. Quá trình biến đổi cho phép có thể xác định được theo thử nghiệm bằng cách tạo xen đoạn, làm khuyết đoạn, hoặc thay thế có hệ thống các axit amin ở phân tử polypeptit nhờ các kỹ thuật tái tổ hợp ADN và thử nghiệm các thể biến dị tái tổ hợp thu được về hoạt tính.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ nhân tính hoá được sử dụng đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên thu được từ phân tử gắn kết kháng nguyên không phải ở người, ví dụ, kháng thể chuột, kháng thể này giữ được hoặc về cơ bản giữ được các đặc tính gắn kết kháng nguyên của phân tử gốc nhưng ít tạo miễn dịch ở người. Kháng thể này có thể thu được bằng các phương pháp khác nhau bao gồm (a) cấy

ghép các vùng biến đổi hoàn toàn không phải ở người lên các vùng không đổi ở người để tạo ra các kháng thể dạng khảm, (b) chỉ cấy ghép các CDR không phải ở người lên các vùng không đổi và khung ở người có hoặc không giữ lại các gốc khung quan trọng (ví dụ, các gốc đó là quan trọng để giữ lại ái lực gắn kết kháng nguyên tốt hoặc các chức năng của kháng thể), hoặc (c) cấy ghép các vùng biến đổi không hoàn toàn ở người, nhưng "giấu" chúng bằng phần giống của người nhờ thay thế các gốc bề mặt. Các phương pháp này được đề cập trong Jones et al., Morrison et al., Proc. Natl. Acad.Sci., 81: 6851-6855 (1984); Morrison and Oi, Adv. Immunol., 44: 65-92(1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536 (1988); Padlan, Molec. Immun., 28: 489-498 (1991); Padlan, Molec. Immun., 31 (3): 169-217 (1994), tất cả tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Thường có ba vùng xác định bổ trợ, hoặc các CDR, (CDR1, CDR2 và CDR3) ở từng vùng trong các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể, nó nằm sát cạnh dưới bốn khoảng khung (nghĩa là, FR1, FR2, FR3, và FR4) ở từng vùng trong các vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể: FR1-CDR1-FR2-CDR2-FR3-CDR3-FR4. Ngoài những cái khác, thảo luận về các kháng thể được nhân tính hoá có thể được thấy trong patent Mỹ số 6,632, 927, và công bố đơn Mỹ số 2003/0175269, cả hai tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Tương tự, như được sử dụng ở đây, thuật ngữ được làm cho có tính của động vật linh trưởng được sử dụng để đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên thu được từ phân tử gắn kết kháng nguyên không phải là động vật linh trưởng, ví dụ, kháng thể chuột, kháng thể này giữ lại hoặc về cơ bản giữ lại được các đặc tính gắn kết của phân tử gốc nhưng ít tạo miễn dịch hơn ở động vật linh trưởng.

Đối với trường hợp trong đó có hai hoặc nhiều định nghĩa về thuật ngữ được sử dụng và/hoặc chấp nhận trong phân kỹ thuật, thì định nghĩa được sử dụng ở đây sẽ bao gồm tất cả các nghĩa trừ khi có chỉ định rõ ràng trái ngược. Ví dụ cụ thể về việc sử dụng thuật ngữ "vùng xác định bổ trợ" ("CDR") để mô tả các vị trí gắn kết kháng nguyên không giáp nhau được thấy ở vùng có thể biến đổi của cả hai polypeptit

chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Vùng đặc biệt này được Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) và bởi Chothia et al., J. Mol. Biol. 196: 901-917 (1987) mô tả, các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn, trong đó các định nghĩa bao gồm sự trùng khớp hoặc các tập hợp con các gốc axit amin nếu so với mỗi định nghĩa khác. Tuy nhiên, sáng chế gồm hoặc định nghĩa của chúng đề cập đến CDR của kháng thể hoặc các thể biến dị của chúng sẽ nằm trong phạm vi của thuật ngữ như được xác định và sử dụng ở đây. Các gốc axit amin thích hợp bao gồm các CDR như được xác định ở đây bằng mỗi tài liệu trong các tài liệu nêu trên được nêu dưới đây trong Bảng I như so sánh. Số gốc chính xác bao gồm CDR đặc biệt sẽ thay đổi tùy thuộc vào trình tự và kích cỡ CDR. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể thường xác định các gốc nào chứa CDR đặc biệt dựa vào trình tự axit amin trong vùng có thể biến đổi của kháng thể.

Bảng 1. Các định nghĩa CDR¹

	Kabat	Chothia	AbM
V _H CDR1	31-35	26-32	26-35
V _H CDR2	50-65	52-58	50-58
V _H CDR3	95-102	95-102	95-102
V _L CDR1	24-34	26-32	
V _L CDR2	50-56	50-52	
V _L CDR3	89-97	91-96	

¹Đánh số tất cả các định nghĩa CDR ở Bảng 1 theo quy ước đánh số được Kabat et al. đưa ra (xem dưới đây).

Kabat et al. cũng xác định hệ đánh số đối với các trình tự vùng có thể biến đổi là thích hợp với bất kỳ kháng thể nào. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể chỉ định hệ “đánh số Kabat” cho bất kỳ trình tự vùng có thể biến đổi nào, không có sự tin cậy vào thông số thử nghiệm bất kỳ nào ngoại trừ chính trình tự

này. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ “đánh số Kabat” đề cập đến hệ đánh số được Kabat et al., U. S. Dept. of Health and Human Services, "Sequences of Proteins of Immunological Interest" (1983) đưa ra. Trừ khi có quy định khác, các viện dẫn đến cách đánh số các vị trí gốc axit amin đặc hiệu trong ABM là theo hệ đánh số Kabat. Các trình tự trong danh sách trình tự (nghĩa là, SEQ ID NO:1 đến SEQ ID NO:78) không được đánh số theo hệ đánh số Kabat.

Nhờ axit nucleic hoặc polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất, ví dụ, tương đồng 95% với trình tự nucleotit tham khảo theo sáng chế, nên được dự tính rằng trình tự nucleotit của polynucleotit tương đồng với trình tự tham khảo ngoại trừ là trình tự polynucleotit có thể bao gồm tới 5 đột biến điểm trên từng 100 nucleotit của trình tự nucleotit tham khảo. Nói cách khác, để thu được polynucleotit có trình tự nucleotit ít nhất tương đồng 95% với trình tự nucleotit, có đến 5% nucleotit trong trình tự tham khảo có thể được làm khuyết đoạn hoặc thay thế bằng nucleotit khác, hoặc số lượng nucleotit lên đến 5% số nucleotit tổng trong trình tự tham khảo có thể được xen đoạn vào trình tự tham khảo. Trình tự yêu cầu có thể là trình tự nguyên vẹn thể hiện hoặc trong Fig.24 hoặc Fig.25.

Thực tế, liệu bất kỳ phân tử axit nucleic hoặc polypeptit đặc biệt nào có độ tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit hoặc trình tự polypeptit theo sáng chế có thể được xác định thông thường nhờ sử dụng các chương trình máy tính đã biết không. Phương pháp được ưu tiên để xác định trình tự hợp toàn diện nhất giữa trình tự yêu cầu (trình tự theo sáng chế) và trình tự đối tượng, cũng đề cập tới như là sự liên kết trình tự tổng thể, có thể được xác định nhờ sử dụng chương trình máy tính FASTDB dựa vào thuật toán của Brutlag et al., Comp. App. Biosci. 6:237-245 (1990). Theo sự liên kết trình tự thì các trình tự yêu cầu và trình tự đối tượng cả hai là các trình tự ADN. Trình tự ARN có thể được so sánh bằng cách chuyển hoá U's thành T's. Kết quả của sự liên kết trình tự tổng thể này nằm trong phần trăm đồng nhất. Các thông số được ưu tiên được sử dụng trong sự liên kết FASTDB của các trình tự ADN để xác định phần trăm đồng nhất là:

Matrix=Unitary, k-tuple=4, Mismatch Penalty=1, Joining Penalty=30, Randomization Group Length=0, Cutoff Score=1, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty 0,05, Window Size=500 hoặc chiều dài của trình tự nucleotit đối tượng, bất cứ chiều dài nào ngắn hơn.

Nếu trình tự đối tượng ngắn hơn trình tự yêu cầu vì các khuyết đoạn 5' hoặc 3', không vì các khuyết đoạn bên trong, sự hiệu chỉnh thủ công có thể được thực hiện để tạo ra các kết quả. Điều này là vì chương trình FASTDB không tính đến các cắt cụt 5' và 3' của trình tự đối tượng khi xác định phần trăm tương đồng. Đối với các trình tự đối tượng cắt cụt ở các đầu 5' hoặc 3', tỷ lệ với trình tự yêu cầu, phần trăm tương đồng được hiệu chỉnh bằng cách xác định số bazơ của trình tự yêu cầu mà là đầu 5' và 3' của trình tự đối tượng, nó không tương xứng/xếp thẳng hàng, là phần trăm của bazơ tổng của trình tự yêu cầu. Nucleotit được làm tương xứng/xếp thẳng hàng được xác định nhờ kết quả của sự sắp xếp trình tự FASTDB. Tỷ lệ phần trăm này sau đó được trừ đi từ phần trăm tương đồng, tính toán bằng chương trình FASTDB nhờ sử dụng các thông số đặc biệt, để đạt được tỷ lệ phần trăm tương đồng cuối cùng. Tỷ lệ hiệu chỉnh này là tỷ lệ được sử dụng cho mục đích của sáng chế. Chỉ các bazơ bên ngoài các bazơ 5' và 3' của trình tự đối tượng, như được thể hiện nhờ sự sắp xếp FASTDB, nó không được tương xứng/xếp thẳng hàng với trình tự yêu cầu, được xác định cho các mục đích điều chỉnh thủ công tỷ lệ phần trăm tương đồng.

Ví dụ, trình tự đối tượng bazơ thứ 90 được sắp thẳng hàng với trình tự yêu cầu bazơ thứ 100 để xác định phần trăm tương đồng. Các khuyết đoạn xuất hiện ở đầu 5' của trình tự đối tượng và vì vậy, việc sắp xếp FASTDB không thể hiện sự tương xứng/xếp thẳng hàng của 10 bazơ thứ nhất ở đầu 5'. 10 bazơ không cặp đôi là 10% trình tự (số lượng các bazơ ở các đầu 5' và 3' không tương xứng/số lượng tổng các bazơ trong trình tự yêu cầu) cho nên 10% được trừ đi từ tỷ lệ phần trăm tương đồng được xác định bằng chương trình FASTDB. Nếu 90 bazơ còn lại được tương xứng tuyệt đối thì phần trăm tương đồng cuối cùng sẽ là 90%. Trong một ví dụ khác, trình tự đối tượng bazơ thứ 90 được so với trình tự yêu cầu bazơ thứ 100. Lần này các

khuyết đoạn là các khuyết đoạn bên trong do đó không có các bazơ trên vị trí 5' hoặc 3' của trình tự đối tượng được tương xứng/xếp thẳng hàng với trình tự yêu cầu. Đối với trường hợp phần trăm tương đồng được xác định bằng FASTDB không được hiệu chỉnh thủ công. Thêm một lần nữa, chỉ các bazơ 5' và 3' của trình tự đối tượng không được tương xứng/xếp thẳng hàng với trình tự yêu cầu được hiệu chỉnh thủ công thay cho. Không có sự hiệu chỉnh thủ công nào được tạo ra cho các mục đích của sáng chế.

Nhờ polypeptit có trình tự axit amin ít nhất, ví dụ, tương đồng 95% với trình tự axit amin yêu cầu theo sáng chế, nên được dự tính rằng trình tự axit amin của polypeptit đối tượng tương đồng với trình tự yêu cầu ngoại trừ là trình tự polypeptit có thể bao gồm tới 5 biến đổi axit amin trên hàng 100 axit nucleotit của trình tự axit amin yêu cầu. Nói cách khác, để thu được polypeptit có trình tự axit amin ít nhất tương đồng 95% với trình tự axit amin yêu cầu, có đến 5% gốc axit amin trong trình tự đối tượng có thể được xen đoạn, làm khuyết đoạn hoặc thay thế bằng axit amin khác. Các biến đổi của trình tự tham khảo có thể xuất hiện ở các vị trí tận cùng amino hoặc carboxy của trình tự axit amin tham khảo hoặc ở vị trí bất kỳ nào giữa các vị trí tận cùng đó, đặt rải rác hoặc riêng rẽ trong các gốc trong trình tự tham khảo hoặc ở một hoặc nhiều nhóm kề nhau trong trình tự tham khảo.

Thực tế, liệu bất kỳ polypeptit đặc biệt nào có độ tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự polypeptit tham khảo có thể được xác định theo cách thông thường nhờ sử dụng các chương trình máy tính đã biết không. Phương pháp được ưu tiên để xác định trình tự hợp toàn diện nhất giữa trình tự yêu cầu (trình tự theo sáng chế) và trình tự đối tượng, cũng đề cập tới như là sự liên kết trình tự tổng thể, có thể được xác định nhờ sử dụng chương trình máy tính FASTDB dựa vào thuật toán của Brutlag et al., *Comp. App. Biosci.* 6:237-245 (1990). Theo sự liên kết trình tự thì các trình tự yêu cầu và trình tự đối tượng cả hai là các trình tự ADN. Trình tự ARN có thể được so sánh bằng cách chuyển hoá U's thành T's. Kết quả của sự liên kết trình tự tổng thể này nằm trong phần trăm đồng

nhất. Các thông số được ưu tiên được sử dụng trong sự liên kết FASTDB của các trình tự ADN để xác định phần trăm đồng nhất là: Matrix=PAM 0, k-tuple=2, MismatchPenalty=1, Joining Penalty=20, Randomization Group Length=0, Cutoff Score=1, Window Size=chiều dài trình tự, Gap Penalty=5, Gap Size Penalty=0,05, Window Size=500 hoặc chiều dài của trình tự axit amin đối tượng, bất cứ chiều dài nào ngắn hơn.

Nếu trình tự đối tượng ngắn hơn trình tự yêu cầu do các khuyết đoạn tận cùng N- hoặc C-, không vì các khuyết đoạn bên trong, sự hiệu chỉnh thủ công có thể được thực hiện để tạo ra các kết quả. Điều này là vì chương trình FASTDB không tính đến các cắt cụt tận cùng N- và C- của trình tự đối tượng khi xác định phần trăm tương đồng tổng thể. Đối với các trình tự đối tượng cắt cụt ở các đầu N- và C-, tỷ lệ với trình tự yêu cầu, phần trăm tương đồng được hiệu chỉnh bằng cách xác định số các gốc của trình tự yêu cầu mà là đầu tận cùng N- và C- của trình tự đối tượng, nó không tương xứng/xếp thẳng hàng với gốc đối tượng tương ứng, là phần trăm của bazơ tổng của trình tự yêu cầu. Liệu gốc được làm tương xứng/xếp thẳng hàng có được xác định nhờ các kết quả của sự sắp xếp trình tự FASTDB không. Tỷ lệ phần trăm này sau đó được trừ đi từ phần trăm tương đồng, tính toán bằng chương trình FASTDB nêu trên nhờ sử dụng các thông số đặc biệt, để đạt được tỷ lệ phần trăm tương đồng cuối cùng. Tỷ lệ phần trăm tương đồng cuối cùng này được tỷ lệ được sử dụng cho các mục đích của sáng chế. Chỉ các gốc đến các đầu tận cùng N- và C- của trình tự đối tượng mà không được tương xứng/xếp thẳng hàng với trình tự yêu cầu, được xác định sử dụng cho các mục đích điều chỉnh thủ công tỷ lệ phần trăm tương đồng. Nghĩa là, chỉ các vị trí gốc yêu cầu ngoài các gốc tận cùng N- và C- xa nhất của trình tự đối tượng.

Ví dụ, trình tự đối tượng gốc axit amin thứ 90 được sắp thẳng hàng với trình tự yêu cầu gốc thứ 100 để xác định phần trăm tương đồng. Khuyết đoạn xuất hiện ở đầu tận cùng N- của trình tự đối tượng và vì vậy, việc sắp xếp FASTDB không thể hiện sự tương xứng/xếp thẳng hàng của 10 gốc thứ nhất ở đầu tận cùng N-. 10 gốc không

cặp đôi là 10% trình tự (số lượng các gốc ở các đầu tận cùng N- và C- không tương xứng/số lượng tổng các gốc trong trình tự yêu cầu) cho nên 10% được trừ đi từ tỷ lệ phần trăm tương đồng được xác định bằng chương trình FASTDB. Nếu 90 gốc còn lại được tương xứng tuyệt đối thì phần trăm tương đồng cuối cùng sẽ là 90%. Trong một ví dụ khác, trình tự đối tượng gốc thứ 90 được so với trình tự yêu cầu gốc thứ 100. Lần này các khuyết đoạn là các khuyết đoạn bên trong do đó không có các gốc ở các đầu tận cùng N- hoặc C- của trình tự đối tượng được tương xứng/xếp thẳng hàng với trình tự yêu cầu. Đối với trường hợp phần trăm tương đồng được xác định bằng FASTDB không được hiệu chỉnh thủ công. Thêm một lần nữa, chỉ các vị trí gốc bên ngoài các đầu tận cùng N- và C- của trình tự đối tượng, như được thể hiện trong sự sắp xếp FASTDB, không được tương xứng/xếp thẳng hàng với trình tự yêu cầu được hiệu chỉnh thủ công thay cho. Không có sự hiệu chỉnh thủ công nào được tạo ra cho các mục đích của sáng chế.

Như được sử dụng ở đây, axit nucleic để "lai hoá trong các điều kiện nghiêm ngặt" đến trình tự axit nucleic theo sáng chế, đề cập đến polynucleotit được lai hoá trong quá trình ủ qua đêm ở 42°C trong dung dịch chứa 50% formamit, 5xSSC (NaCl 750mM, natri xitrat 75mM), natri phosphat 50mM (độ pH=7,6), 5x dung dịch Denhardt, 10% dextran sulfat, và 20µg/ml ADN tinh dịch cá hồi, đã cắt, được làm biến tính, tiếp theo rửa các màng lọc trong 0,1xSSC ở 65°C.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ vùng xác định vị trí *Golgi* đề cập đến trình tự axit amin của polypeptit cư trú tại Golgi có thể đáp ứng để neo polypeptit ở vị trí trong phức hệ Golgi. Nói chung, vùng xác định vị trí bao gồm "đuôi" tận cùng amino của enzym.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ chức năng tác động đề cập đến các hoạt tính sinh học có thể cho là của vùng Fc (vùng trình tự âm tính Fc hoặc vùng trình tự axit amin của biến thể Fc) của kháng thể. Các ví dụ về các chức năng tác động kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ái lực gắn kết thụ thể Fc, tính gây độc tế bào

phụ thuộc kháng thể (ADCC), sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), tiết xuất phân bào, sự hấp thu kháng nguyên được tạo ra bởi phức hệ miễn dịch nhờ các tế bào biểu thị bằng kháng nguyên, điều chỉnh giảm các thụ thể bề mặt tế bào, v.v..

Như được sử dụng ở đây, các thuật ngữ xử lý, được xử lý, xử lý và xử lý bằng cách glycozyl hoá được dự tính bao gồm bất kỳ thao tác nào của kiểu glycozyl hoá của polypeptit xuất hiện tự nhiên hoặc tái tổ hợp hoặc một đoạn của chúng. Xử lý bằng cách glycozyl hoá bao gồm xử lý chuyển hoá cơ cấu glycozyl hoá tế bào, kể cả các thao tác di truyền của các cách tổng hợp oligosacarit để đạt được sự glycozyl hoá của các glycoprotein biểu hiện trong các tế bào. Ngoài ra, xử lý bằng cách glycozyl hoá bao gồm các tác động bằng quá trình đột biến và môi trường tế bào đối với quá trình glycozyl hoá.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ tế bào chủ bao gồm bất kỳ loại hệ tế bào nào có thể được xử lý để tạo ra các polypeptit và các phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế. Theo một phương án, tế bào chủ được xử lý cho phép quá trình tạo ra phân tử gắn kết kháng có các glycoform cải biến. Theo một phương án được ưu tiên, phân tử gắn kết kháng nguyên là kháng thể, một đoạn kháng thể hoặc protein thể dung hợp. Theo một số phương án, các tế bào chủ còn được thao tác để biểu hiện các mức tăng của một hoặc nhiều polypeptit có hoạt tính GnTIII. Các tế bào chủ bao gồm các tế bào được nuôi cấy, ví dụ, các tế bào động vật có vú được nuôi cấy, như các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NSO, các tế bào SP2/0, các tế bào u tủy YO, tế bào u tủy chuột P3X63, tế bào PER, tế bào PER. C6 hoặc tế bào lai, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, và các tế bào thực vật, chỉ gọi tên một vài loại, nhưng còn bao gồm cả các tế bào của động vật chuyển gen, thực vật chuyển gen hoặc mô động vật.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ tính gây độc tế bào tạo ra bởi FC bao gồm tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể và tính gây độc tế bào được tạo ra bởi protein dung hợp bằng Fc tan được chứa vùng Fc ở người. Nó là cơ chế miễn dịch tạo

ra sự phân giải của "các tế bào đích kháng thể" nhờ "các tế bào tác động miễn dịch ở người", trong đó:

Các tế bào tác động miễn dịch ở người là quần thể bạch cầu thể hiện các thụ thể Fc trên bề mặt của chúng qua đó chúng gắn kết với vùng Fc của các kháng thể hoặc các protein dung hợp bằng Fc và thực hiện các chức năng tác động. Quần thể này có thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và/hoặc các tế bào giết tự nhiên (NK).

Các tế bào đích kháng thể là các tế bào gắn kết bằng các kháng thể hoặc các protein dung hợp bằng Fc. Các kháng thể hoặc các protein dung hợp bằng Fc gắn kết với các tế bào đích qua đầu tận cùng N tách protein đến vùng Fc.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ tính gây độc tế bào được tạo ra bởi Fc tăng được xác định hoặc là tăng về số lượng của "các tế bào đích kháng thể" được phân giải trong thời gian định trước, ở nồng độ định trước của kháng thể, hoặc của protein dung hợp bằng Fc, trong môi trường xung quanh các tế bào đích, bằng cơ chế của tính gây độc tế bào được tạo ra bởi Fc xác định ở trên, và/hoặc giảm ở nồng độ của kháng thể, hoặc của protein dung hợp bằng Fc, trong môi trường xung quanh các tế bào đích, trong thời gian định trước, bằng cơ chế của tính gây độc tế bào được tạo ra bởi Fc. Sự gia tăng trong tính gây độc tế bào được tạo ra bởi Fc tỷ lệ với tính gây độc tế bào được tạo ra bằng kháng thể tương tự, hoặc protein dung hợp bằng Fc, được tạo ra bằng loại tế bào chủ tương tự, nhờ sử dụng quá trình điều chế, tinh chế, bào chế và các phương pháp lưu giữ chuẩn, các phương pháp này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng không được tạo ra bằng các tế bào chủ đã xử lý để biểu hiện glycosyltransferaza GnTIII bằng các phương pháp mô tả ở đây.

Nhờ kháng thể có tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể tăng (ADCC) có nghĩa là kháng thể, như thuật ngữ được định nghĩa ở đây, có ADCC tăng như được xác định bằng bất kỳ phương pháp thích hợp nào đã biết đối

với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Thử nghiệm in vitro ADCC được chấp nhận là như sau:

1) thử nghiệm sử dụng các tế bào đích đã biết để biểu hiện kháng nguyên đích được nhận ra nhờ vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể;

2) thử nghiệm sử dụng các tế bào đơn nhân máu ngoại vi ở người (PBMCs), được phân lập từ máu của người cho khỏe mạnh chọn ngẫu nhiên, làm các tế bào tác động;

3) thử nghiệm được tiến hành theo phương pháp dưới đây:

i) các PBMC được phân lập nhờ sử dụng các phương pháp ly tâm mật độ chuẩn và được tạo huyền phù với 5×10^6 tế bào/ml trong môi trường nuôi cấy RPMI;

ii) các tế bào đích được nuôi cấy bằng phương pháp nuôi cấy mô chuẩn, thu từ pha sinh trưởng lũy thừa với khả năng sống lớn hơn 90%, rửa trong môi trường nuôi cấy tế bào RPMI, đánh dấu bằng 100 micro-Curies chứa ^{51}Cr , rửa hai lần bằng môi trường nuôi cấy tế bào, và tái tạo huyền phù trong môi trường nuôi cấy tế bào với mật độ 10^5 tế bào/ml;

iii) 100 microlit gồm huyền phù tế bào đích cuối cùng nêu trên được chuyển vào mỗi giếng của đĩa vi chuẩn độ 96 giếng;

iv) kháng thể được pha loãng theo từng phần từ 4000ng/ml đến 0,04ng/ml trong môi trường nuôi cấy tế bào và 50microlit chứa các dung dịch kháng thể thu được được thêm vào các tế bào đích trong đĩa vi chuẩn độ 96 giếng, thử nghiệm với ba nồng độ kháng thể khác nhau bao gồm phạm vi nồng độ kháng thể tổng nêu trên;

v) đối với các đối chứng giải phóng tối đa (MR), 3 giếng bổ sung trong đĩa chứa các tế bào đích đánh dấu, nhận 50 microlit chứa 2% dung dịch nước tẩy không ion (V/V) (Nonidet, Sigma, St. Louis), thay cho dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vi) đối với các đối chứng giải phóng tự phát (SR), 3 giếng bổ sung trong đĩa chứa các tế bào đích đánh dấu, nhận 50 microlit môi trường nuôi cấy tế bào RPMI thay cho dung dịch kháng thể (điểm iv nêu trên);

vii) sau đó đĩa vi chuẩn độ 96 giếng được ly tâm ở 50xg trong 1 phút và ủ trong 1 giờ ở 4°C;

viii) 50 microlit huyền phù PBMC (điểm i nêu trên) được thêm vào mỗi giếng để thu được tỷ lệ tế bào tác động: tế bào đích là 25:1 và các đĩa được đặt trong máy ấp trong 5% khí CO₂ ở 37°C trong 4 giờ;

ix) dịch nổi không chứa tế bào từ mỗi giếng được thu gom và độ phóng xạ giải phóng qua thử nghiệm (ER) được xác định số lượng nhờ sử dụng máy đếm gama;

x) phần trăm phân giải đặc hiệu được tính toán đối với mỗi nồng độ kháng thể theo công thức $(ER-MR)/(MR-SR) \times 100$, trong đó ER là độ phóng xạ trung bình được xác định (xem điểm ix nêu trên) đối với nồng độ kháng thể đó, MR là độ phóng xạ trung bình được xác định (xem điểm ix nêu trên) đối với các đối chứng MR (xem điểm v nêu trên), và SR là độ phóng xạ trung bình được xác định (xem điểm ix nêu trên) đối với các đối chứng SR (xem điểm vi nêu trên);

4) "ADCC tăng" được xác định là hoặc tăng ở phần trăm phân giải đặc hiệu tối đa thấy được trong phạm vi nồng độ kháng thể thử nghiệm nêu trên, và/hoặc giảm ở nồng độ kháng thể cần có để đạt được một nửa phần trăm phân giải đặc hiệu tối đa thấy được trong phạm vi nồng độ kháng thể thử nghiệm nêu trên. Tăng trong ADCC tỷ lệ với ADCC, được xác định bằng thử nghiệm nêu trên, được gây ra bằng kháng thể tương tự, được tạo ra bằng loại tế bào chủ giống nhau, nhờ sử dụng quá trình sản xuất, tinh chế, bào chế và các phương pháp lưu giữ chuẩn, các phương pháp này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật, nhưng không được tạo ra bằng các tế bào chủ được xử lý để biểu hiện quá mức GnTIII.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên có ái lực gắn kết của kháng thể chuột B-Lyl, và đến việc phát hiện ra các chức năng tác động có thể được tăng cường nhờ quá trình glycozyl hoá thay đổi. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên là kháng thể dạng khảm. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến kháng thể dạng khảm, hoặc một đoạn của chúng, chứa các CDR thể hiện trên Fig.7. Đặc biệt, theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa: (a) trình tự được chọn từ nhóm gồm có: SEQ IDNO:5, SEQ ID NO:6 và SEQ IDNO:7 (CDR V_{H-1}); và (b) trình tự được chọn từ nhóm gồm có: SEQ IDNO:21, SEQ IDNO:22 và SEQ IDNO: 23 (CDR V_{H-2}); và SEQ ID NO:24. Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa SEQ IDNO:8, SEQ ID NO:9 và SEQ IDNO:10. (CDRs V_L). Theo một phương án, polynucleotit bất kỳ nào trong số các polynucleotit mã hoá polypeptit thể dung hợp.

Theo một phương án khác, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa vùng V_H của kháng thể chuột B-Lyl thể hiện trên Fig.1, hoặc biến thể của chúng; và polypeptit không phải ở chuột. Theo một phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa vùng V_L của kháng thể chuột B-Lyl thể hiện trên Fig.2, hoặc biến thể của chúng; và polypeptit không phải ở chuột.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến các phân tử gắn kết kháng nguyên chứa một hoặc nhiều CDR được cắt cụt của BLy-1. Các CDR cắt cụt sẽ chứa, ở mức tối thiểu, các gốc axit amin xác định bằng tính đặc hiệu đối với CDR đã cho. Nhờ "gốc xác định bằng tính đặc hiệu" có nghĩa là các gốc có liên quan trực tiếp trong quá trình tương tác với kháng nguyên. Nói chung, chỉ khoảng một phần năm đến một phần ba các gốc trong CDR đã cho tham gia gắn kết kháng nguyên. Các gốc xác định bằng tính đặc hiệu trong CDR đặc biệt có thể được nhận dạng bởi, ví dụ, sự ước tính của các tiếp xúc tương tác từ kiểu ba kích cỡ và quá trình xác định tính biến đổi của trình tự ở vị trí gốc đã cho theo các phương pháp mô tả trong tài liệu Padlan

etal., FASEB J. 9 (1):133-139 (1995), toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Vì vậy, sáng chế còn đề cập đến polynucleotit phân lập chứa ít nhất một vùng xác định bổ trợ của kháng thể chuột, hoặc biến thể hoặc dạng cắt cụt của chúng chứa ít nhất các gốc xác định bằng tính đặc hiệu đối với vùng xác định bổ trợ nêu trên, trong đó polynucleotit phân lập này mã hoá polypeptit thể dung hợp. Tốt hơn nếu, các polynucleotit phân lập này mã hoá polypeptit thể dung hợp là phân tử gắn kết kháng nguyên. Theo một phương án, polynucleotit chứa ba vùng xác định bổ trợ của kháng thể chuột B-Lyl, hoặc các biến thể hoặc các dạng cắt cụt của chúng chứa ít nhất các gốc xác định bằng tính đặc hiệu đối với mỗi vùng trong ba vùng xác định bổ trợ nêu trên. Theo một phương án khác, polynucleotit mã hoá vùng biến đổi hoàn toàn của chuỗi nặng hoặc nhẹ của kháng thể dạng khảm (ví dụ, được nhân tính hoá). Sáng chế còn đề cập đến các polypeptit mã hoá bằng các polynucleotit này.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến phân tử gắn kết kháng nguyên chứa ít nhất một vùng xác định bổ trợ của kháng thể chuột B-Lyl, hoặc biến thể hoặc dạng cắt cụt của chúng chứa ít nhất các gốc xác định bằng tính đặc hiệu đối với vùng xác định bổ trợ nêu trên, và chứa trình tự thu được từ polypeptit không tương đồng. Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa ba vùng xác định bổ trợ của kháng thể chuột B-Lyl, hoặc các biến thể hoặc dạng cắt cụt của chúng chứa ít nhất các gốc xác định bằng tính đặc hiệu đối với mỗi vùng trong ba vùng xác định bổ trợ nêu trên. Theo một khía cạnh, phân tử gắn kết kháng nguyên chứa vùng có thể biến đổi của chuỗi kháng thể nặng hoặc nhẹ. Theo một phương án được sử dụng đặc biệt, phân tử gắn kết kháng nguyên là dạng khảm, ví dụ kháng thể, được nhân tính hoá. Sáng chế cũng đề cập đến các phương pháp tạo ra các phân tử gắn kết kháng nguyên, và việc sử dụng tương tự để điều trị bệnh, bao gồm u lympho tế bào B.

Đã biết rằng một vài cơ chế có liên quan đến hiệu quả điều trị của các kháng thể kháng CD20, bao gồm tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC), tính

gây độc tế bào phụ thuộc bổ trợ (CDC), và sự cảm ứng của quá trình ngừng sinh trưởng hoặc quá trình tăng sinh quá mức. Ví dụ, phần lớn dấu hiệu thử nghiệm chứng tỏ rằng rituximab có tác dụng qua các cơ chế tác động thông thường được xác định bằng các thử nghiệm CDC và ADCC. Tương tự, đã được chứng minh rằng sức đề kháng của các tế bào u lympho biệt hoá với rituximab in vivo là chức năng của tính nhạy cảm của chúng với CDC in vitro. Ngược lại, cách hoạt động in vivo của kháng thể khác được chấp nhận để sử dụng điều trị, B1, không cần đến hoạt tính tế bào giết bổ trợ mà cũng không cần đến hoạt tính tế bào giết tự nhiên (NK). Đúng hơn, hiệu quả của B1 in vivo là do khả năng của nó gây chết tế bào hiệu nghiệm.

Nói chung, các kháng thể kháng CD20 đơn dòng được chia thành hai loại riêng biệt căn cứ vào cơ chế hoạt động của chúng để diệt trừ tận gốc các tế bào u lympho. Cơ bản các kháng thể kháng CD20 Typ I được sử dụng để bổ trợ cho các tế bào giết đích, trong khi các kháng thể Typ II có tác dụng nhờ các cơ chế khác, chủ yếu là sự tăng sinh quá mức. Rituximab và 1F5 là các ví dụ về các kháng thể kháng CD20 Typ I, nhưng ngược lại B1 là ví dụ về kháng thể Typ II. Ví dụ, xem tài liệu Cragg, M. S. and Glennie, M. J., *Blood* 103 (7): 2738-2743 (April 2004); Teeling, J. L. et al., *Blood* 104 (6): 1793-1800 (September 2004), toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế là một ví dụ đã biết thứ nhất trong đó kháng thể kháng CD20 Typ II được xử lý có các chức năng tác động tăng như ADCC, trong khi vẫn tiếp tục giữ được khả năng gây chết tế bào hiệu nghiệm. Vì vậy, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD20 Typ II có ADCC tăng do quá trình xử lý nêu trên và không mất khả năng quan trọng để gây cảm ứng quá trình tăng sinh quá mức. Theo một phương án, các kháng thể kháng CD20 Typ II được xử lý để có kiểu glycozyl hoá thay đổi trong vùng Fc. Theo một phương án đặc biệt, quá trình glycozyl hoá biến đổi bao gồm lượng các gốc phức hợp cắt đôi tăng ở vùng Fc. Theo một phương án đặc biệt khác, quá trình glycozyl hoá biến đổi bao gồm lượng các gốc fucosa giảm ở vùng Fc. Xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004 0093621 của Shitara et al., toàn bộ tài

liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một phương án khác, các kháng thể kháng CD20 Typ II phải trải qua quá trình xử lý polypeptit như nêu trong patent Mỹ số 6,737, 056 của Presta hoặc công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004 0185045 (Macrogenics) hoặc công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004 0132101 (Xencor), toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp tạo ra các kháng thể được xử lý Typ II này và đến các phương pháp sử dụng các kháng thể này để điều trị các rối loạn tế bào B khác nhau, bao gồm u lympho tế bào B.

Các kháng thể dạng khảm chuột/người đã được mô tả. Ví dụ, xem, Morrison, S. L. et al., PNAS 11: 6851-6854 (tháng 11/1984); Công bố patent châu Âu Số 173494; Boulianna, G. L., et al., Nature 312: 642 (tháng 12/1984); Neubeiger, M. S. et al., Nature 314: 268 (tháng 3/1985); Công bố patent châu Âu Số 125023; Tan et al., J. Immunol. 135: 8564 (tháng 11/1985); Sun, L. K et al., Hybridoma 5 (1): 517 (1986); Sahagan et al., J. Immunol. 137: 1066-1074 (1986). Xem, Muron, Nature 312: 597 (tháng 12/1984); Dickson, Genetic Engineering News 5 (3) (tháng 3/1985); Marx, Science 229: 455 (tháng 8/1985); and Morrison, Science 229: 1202-1207 (tháng 9/1985). Robinson et al., trong công bố đơn PCT số WO/88104936 mô tả kháng thể dạng khảm với vùng không đổi ở người và vùng có thể biến đổi ở chuột, có tính đặc hiệu đối với epitop của CD20; phần kháng thể dạng khảm ở chuột trong các tài liệu tham khảo Robinson thu được từ kháng thể đơn dòng chuột 2H7 (gama 2b, kappa). Trong khi các tài liệu tham khảo khác lưu ý rằng kháng thể dạng khảm được mô tả là “ứng cử viên quan trọng nhất” để điều trị các rối loạn tế bào B, tuyên bố này được xem như không nhiều hơn một gợi ý đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật để xác định dù gợi ý này có chính xác hay không đối với kháng thể đặc biệt này, đặc biệt vì tài liệu không có bất kỳ thông số nào để ủng hộ điều khẳng định về hiệu quả điều trị và quan trọng là thông số sử dụng động vật bậc cao hơn như động vật linh trưởng hoặc người.

Các phương pháp để tạo ra các kháng thể dạng khảm có thể sử dụng được đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Ví dụ, các chuỗi nặng và nhẹ có thể biểu hiện riêng rẽ, nhờ, ví dụ, chuỗi nhẹ globulin miễn dịch và chuỗi nặng globulin miễn dịch trong các plasmit riêng biệt, hoặc đối với vật truyền đơn (ví dụ, đa gen). Sau đó các chuỗi này có thể được làm sạch và tập hợp in vitro vào các kháng thể hoàn chỉnh; các phương pháp để thực hiện việc tập hợp này được mô tả. Ví dụ, xem tài liệu Scharff, M., Harvey Lectures 69:125 (1974). Các thông số phản ứng in vitro đối với quá trình tạo ra các kháng thể IgG từ các chuỗi nặng và nhẹ phân lập giảm cũng được mô tả. Ví dụ, xem tài liệu Sears et al., Biochem. 16 (9):2016-25 (1977).

Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, ABM dạng khảm theo sáng chế là kháng thể được nhân tính hoá. Các phương pháp để nhân tính hoá các kháng thể không phải của người là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Ví dụ, các ABM được nhân tính hoá theo sáng chế có thể được tạo ra theo các phương pháp của patent Mỹ số 5,225,539 của Winter, patent Mỹ số 6,180,370 của Queen et al., hoặc patent Mỹ số 6,632,927 của Adair et al., toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Tốt hơn nếu, kháng thể được nhân tính hoá có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào từ nguồn không phải ở người. Các gốc axit amin không phải ở người thường được đề cập tới như là các gốc "nhập khẩu", nó thường được lấy từ vùng "nhập khẩu" có thể biến đổi. Quá trình nhân tính hoá về cơ bản có thể được tiến hành theo phương pháp của Winter và các đồng tác giả (Jones et al., Nature, 321: 522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332: 323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239: 1534-1536(1988)), bằng cách thay thế các trình tự vùng có thể biến đổi nhanh cho các trình tự tương ứng của kháng thể người. Vì vậy, các kháng thể "được nhân tính hoá" này là các kháng thể dạng khảm (Patent Mỹ số 4,816, 567) trong đó về cơ bản ít hơn một vùng có thể biến đổi nguyên vẹn ở người được thay thế bằng trình tự tương ứng từ các loài không phải là người. Thực tế, các kháng thể được nhân tính hoá thường là các kháng thể người trong đó một số gốc vùng có thể biến đổi nhanh

và có thể một số gốc FR được thể bằng các gốc từ các vị trí tương tự ở các kháng thể loài gặm nhấm. Các kháng thể kháng CD20 được nhân tính hoá đối tượng sẽ bao gồm các vùng không đổi của globulin miễn dịch người.

Việc lựa chọn các vùng có thể biến đổi ở người, cả nhẹ và nặng, được sử dụng để tạo ra các kháng thể được nhân tính hoá là rất quan trọng để gây cảm ứng tính kháng nguyên. Theo phương pháp được gọi là "thích hợp nhất", trình tự của vùng có thể biến đổi của kháng thể loài gặm nhấm được tuyển chọn dựa vào toàn bộ thư viện chứa các trình tự vùng có thể biến đổi ở người đã biết. Trình tự người gần nhất với trình tự của loài gặm nhấm sau đó được chấp nhận là khoảng khung ở người (FR) đối với kháng thể được nhân tính hoá (Sims et al., *J. Immunol.*, 151: 2296 (1993); Chothia et al., *J Mol. Biol.*, 196: 901 (1987)). Phương pháp khác để chọn lọc trình tự khung ở người để so với trình tự của mỗi vùng phụ riêng lẻ của khung loài gặm nhấm hoàn chỉnh (nghĩa là, FR1, FR2, FR3, và FR4) hoặc một số tổ hợp của các vùng phụ riêng lẻ (ví dụ, FR1 và FR2) dựa vào thư viện chứa các trình tự vùng có thể biến đổi ở người đã biết tương đương với vùng phụ khung đó (ví dụ., như được xác định nhờ cách đánh số Kabat), và chọn trình tự ở người cho mỗi vùng phụ hoặc tổ hợp gần nhất với trình tự của loài gặm nhấm (Leung công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0040606 A1, công bố 2.7.2003). Phương pháp khác sử dụng khoảng khung đặc biệt thu được từ trình tự liên ứng của tất cả các kháng thể người của nhóm phụ đặc biệt của các chuỗi nặng hoặc nhẹ. Khung tương tự có thể được sử dụng cho một vài kháng thể được nhân tính hoá khác biệt (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89: 4285 (1992); Presta et al., *J Immunol.*, 151: 2623 (1993)).

Quan trọng hơn nữa là các kháng thể được nhân tính hoá duy trì được ái lực cao đối với kháng nguyên và các đặc tính sinh học có ích khác. Để đạt được mục đích này, theo một phương án được ưu tiên, các kháng thể được nhân tính hoá được tạo ra bằng phương pháp phân tích các trình tự gốc và các sản phẩm được nhân tính hoá dựa trên các khái niệm khác nhau nhờ sử dụng ba kiểu kích thước của các trình

gốc và được nhân tính hoá. Ba kiểu kích thước globulin miễn dịch thường sẵn có và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. Các chương trình máy tính có thể sử dụng được được minh họa và thể hiện ba cấu trúc kích thước hình thể có thể có của các trình tự globulin miễn dịch ứng cử chọn lọc. Quá trình kiểm tra sự thể hiện đó cho phép phân tích vai trò có vẻ thích hợp của các gốc trong việc thực hiện chức năng của các trình tự globulin miễn dịch ứng cử, nghĩa là phân tích các gốc có tác động đến khả năng của globulin miễn dịch để gắn kết kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc FR có thể được chọn lọc và kết hợp từ các trình tự tiếp thu và quan trọng để đạt được đặc điểm của kháng thể mong muốn, như làm tăng ái lực đối với (các) kháng nguyên đích. Nói chung, các gốc vùng có thể biến đổi nhanh có tác động trực tiếp và quan trọng nhất đến sự gắn kết kháng nguyên.

Theo một phương án khác, các phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được xử lý để có ái lực gắn kết tăng cường theo, ví dụ, các phương pháp được mô tả trong công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2004/0132066 của Balint et al., toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, phân tử gắn kết kháng nguyên theo sáng chế được liên kết với gốc bổ sung, như chất đồng vị đánh dấu phóng xạ hoặc toxin. Các ABM liên kết này có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các chất đồng vị phóng xạ khác nhau có thể sử dụng được theo sáng chế và người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật tin rằng có khả năng xác định dễ dàng các chất đồng vị phóng xạ nào là thích hợp nhất trong các trường hợp khác nhau. Chẳng hạn, ^{131}I là chất đồng vị phóng xạ đã biết rõ được sử dụng cho liệu pháp miễn dịch đích. Tuy nhiên, việc sử dụng lâm sàng ^{131}I có thể bị giới hạn bởi một vài yếu tố bao gồm thời gian bán rã trong cơ thể kéo dài 8 ngày; quá trình loại halogen của kháng thể iot hoá cả trong máu và ở các vị trí khối u; và các tính chất

phát xạ (ví dụ, thành phần gama lớn) có thể gây điểm cực thuận cho việc lắng đọng định vị liều lượng ở khối u. Nhờ việc đưa vào các chất tạo chelat tốt hơn, cơ hội để gắn các nhóm tạo chelat kim loại vào các protein đã làm tăng các cơ hội để sử dụng các chất đồng vị phóng xạ khác như ^{111}In và ^{90}Y . ^{90}Y tạo ra một số thuận lợi để sử dụng trong ứng dụng liệu pháp miễn dịch bằng phóng xạ: thời gian bán rã 64 giờ của ^{90}Y dài đủ để cho phép tập hợp kháng thể cạnh khối u và, khác eg, ^{131}I , ^{90}Y là chất phát xạ beta tinh khiết có năng lượng cao không kèm theo sự chiếu xạ gama trong sự phân rã của nó, có giới hạn trong mô từ 100 đến 1000 đường kính tế bào. Ngoài ra, lượng bức xạ xâm nhập tối thiểu cho phép để sử dụng các kháng thể đánh dấu ^{90}Y cho bệnh nhân ngoại trú. Ngoài ra, sự tiếp thu kháng thể đánh dấu không cần để giết tế bào, và sự phát tia bức xạ ion hoá cục bộ sẽ gây chết người cho các tế bào khối u kề sát không có kháng nguyên đích.

Các liệu điều trị đơn hữu hiệu (nghĩa là, các lượng điều trị hữu hiệu) chứa các kháng thể kháng CD20 đánh dấu ^{90}Y nằm trong khoảng 5 và 75mCi, tốt hơn nữa nằm trong khoảng 10 và khoảng 40 mCi. Các liệu lượng điều trị đơn cắt bỏ không phải là tuỷ hữu hiệu chứa các kháng thể kháng CD20 đánh dấu ^{131}I nằm trong khoảng 5 và 70mCi, tốt hơn là nằm trong khoảng 5 và 40mCi. Các liệu lượng điều trị đơn cắt bỏ hữu hiệu (có nghĩa là, có thể cần đến quá trình ghép tuỷ xương tự thân) chứa các kháng thể kháng CD20 đánh dấu ^{131}I nằm trong khoảng 30 và 600mCi, tốt hơn nữa là nằm trong khoảng 50 và nhỏ hơn 500mCi. Khi kết hợp với các kháng thể kháng CD20 dạng khảm, do vì thời gian bán rã tuần hoàn dài hơn so với các kháng thể chuột, nên các liệu lượng điều trị đơn cắt bỏ không phải là tuỷ hữu hiệu chứa các kháng thể kháng CD20 dạng khảm đánh dấu ^{131}I nằm trong khoảng 5 và 40mCi, tốt hơn là nhỏ hơn 30mCi. Hình dung tiêu chuẩn đối với, ví dụ, chất đồng vị đánh dấu ^{111}In , thường nhỏ hơn 5mCi.

Đối với các kháng thể kháng CD20 được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ, liệu pháp thêm vào đó có thể cũng xuất hiện nhờ điều trị bằng liệu pháp đơn hoặc đa liệu pháp. Vì các thành phần đồng vị phóng xạ, được ưu tiên là trước khi điều trị, các

tế bào mầm ngoại vi ("PSC") hoặc tuỷ xương ("BM") được "thu gom" cho các bệnh nhân bị tính độc tuỷ xương nguy hại cao do bức xạ. BM và/hoặc PSC được thu gom nhờ sử dụng các kỹ thuật chuẩn, và sau đó được rửa sạch và làm đông lạnh để quá trình tái tiêm truyền có thể thực hiện được. Ngoài ra, được ưu tiên nhất là trước khi điều trị nghiên cứu liều lượng chẩn đoán nhờ sử dụng kháng thể đánh dấu chẩn đoán (ví dụ nhờ sử dụng (ví dụ, nhờ sử dụng ^{111}In) được tiến hành đối với bệnh nhân, mục đích của nó để đảm bảo rằng kháng thể đánh dấu điều trị (ví dụ, nhờ sử dụng ^{90}Y) sẽ không trở thành "cô đặc" không cần thiết trong bất kỳ cơ quan hoặc mô thông thường nào.

Theo một phương án được ưu tiên, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự axit amin như thể hiện trong Bảng 3 dưới đây. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic phân lập chứa trình tự có độ tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit thể hiện trong Bảng 2 dưới đây. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic phân lập chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin trong Bảng 3. Sáng chế cũng bao gồm axit nucleic chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự axit amin có bất kỳ cấu trúc nào trong số các cấu trúc trong Bảng 3 với các thay thế axit amin bảo toàn.

BẢNG 2

CAU TRUC	TRÌNH TỰ NUCLEOTIT	SEQ ID NO
B-HH1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAGCT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAAATCCAAGGAAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAAATCCAAGTACACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	29
B-HH2	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAAATCCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAAATCCAAGTACACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	31
B-HH3	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGCCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAAATCCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAAATCCAAGTACACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TCTGTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCAGCTAGCACC</u>	33

(tiếp tục)		
CAU TRUC	TRÌNH TỰ NUCLEOTIT	SEQ ID NO
B-HH4	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>TCTCCGGATACGGCTTCAGCTATTCTTGGATGAAGT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACGTA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAAACCTGCTCACCCTCT</u> <u>CCTCA</u>	35
B-HH5	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGGCTTCAGCTATTCTTGGATGAAGT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACGTA</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	37
B-HH6	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGGCTTCAGCTATTCTTGGATCAATT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACGTA</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	39
B-HH7	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGAGTTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACGGCTTCAGCTATTCTTGGATCTCGT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACGTA</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	41

(tiếp tục)

CẤU TRÚC	TRÌNH TỰ NUCLEOTIT	SEQ ID NO
B-HH8	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACATACAGCTGGATGAAC</u> <u>TGGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAGGGCAGAGTCACAATT</u> <u>ACCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	43
B-HH9	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGCGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	45
B-HL1	<u>CAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATTCAGGAAGAGTCACAATGA</u> <u>CACGGGACACGTCCACTTCCACCGTCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	47
B-HL2	<u>GAGGTGCAATTGGTGCAGTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGG</u> <u>TGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGCACT</u> <u>GGGTGCAGCAGGCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACGCAGAGAAATTCAGGAAGAGTCACAATC</u> <u>ACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAACCAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	49

(tiếp tục)

CẤU TRÚC	TRÌNH TỰ NUCLEOTIT	SEQ ID NO
B-HL3	<u>GAGGTGCAATTGGTGCACTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGCCTGGGGCCACCGTGAAGATCTCCTGCAAGG</u> <u>TGTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAAGT</u> <u>GGGTGCAGCAGGCCCTGGAAAGGGGCTCGAGTGG</u> <u>GATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTG</u> <u>ACTACAATGGGAAATTCAAGGGAAGAGTCACAATC</u> <u>ACAGCCGACACGTCCACTGACACCGCCTATATGGA</u> <u>GCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGT</u> <u>ATTACTGTGCAACCAATGTCTTTGATGGTTACTGGC</u> <u>TTGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	51
B-HL4	<u>CAGATGCAATTGGTGCACTCTGGCGCTGAAGTTAA</u> <u>GAAGACCGGGAGTTCAGTGAAGGTCTCCTGCAAGG</u> <u>CTTCCGGATACACCTTCACCTATTCTTGGATGAGCT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCCCTGGACAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>ATGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACGCACAGAAATCCAAGGAAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCAGCTAGCACC</u>	53
B-HL8	<u>GAAGTGCACTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT</u> <u>CAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAG</u> <u>CCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAAGT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCTCGAGTGG</u> <u>GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	55
B-HL10	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCACTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGTGCAGCCTCTGGATTGCGATTGAGTAT</u> <u>TCTTGGATGAAGTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	57

(tiếp tục)		
CẤU TRÚC	TRÌNH TỰ NUCLEOTIT	SEQ ID NO
B-HL11	<u>CAGGTGCAGCTGGTGGAGTCTGGAGGAGGCTTGGT</u> <u>CAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGGCTCTCCTGTGCAG</u> <u>CCTCTGGATTACATTTAGCTATTCTTGGATGAACT</u> <u>GGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAAGGGCCTCGAGTGG</u> <u>GTGGGACGGATCTTTCCCGGCGATGGGGATACTGA</u> <u>CTACAATGGGAAATTCAAGGGCAGAGTCACAATTA</u> <u>CCGCCGACAAATCCACTAGCACAGCCTATATGGAG</u> <u>CTGAGCAGCCTGAGATCTGAGGACACGGCCGTGTA</u> <u>TTACTGTGCAAGAAATGTCTTTGATGGTTACTGGCT</u> <u>TGTTTACTGGGGCCAGGGAACCTGGTCAACCGTCT</u> <u>CCTCA</u>	59
B-HL12	<u>CGGAATTCGGCCCAACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTG</u> <u>GAGCAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	61
B-HL13	<u>CGGAATTCGGCCCAACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTCGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCGTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	63

(tiếp tục)

CẤU TRÚC	TRÌNH TỰ NUCLEOTIT	SEQ ID NO
B-HL14	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCTCACTCCGAAGTGCAGCTGGTCGAGTCCG</u> <u>GAGGAGGCTTGAAGAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	65
B-HL15	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCTCTTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	67
B-HL16	<u>CGGAATTCGGCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>GTCAGCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTTTACTGGGGCCAGGGAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	69

(tiếp tục)

CẤU TRÚC	TRÌNH TỰ NUCLEOTIT	SEQ ID NO
B-HL17	<u>CGGAATTCGGCCCCACCGGTGGCCACCATGGACTGG</u> <u>ACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGCAGCAGCCAC</u> <u>AGGAGCCCACTCCGAAGTGCAGCTGGTGGAGTCTG</u> <u>GAGGAGGCTTGGTCAAGCCTGCGGGTCCCTGCGG</u> <u>CTCTCCTGCGCAGCCTCTGGATTACATTTAGCTAT</u> <u>TCTTGGATGAACTGGGTGCGGCAGGCTCCTGGAAA</u> <u>GGGCCCTCGAGTGGGTGGGACGGATCTTTCCCGGCG</u> <u>ATGGGGATACTGACTACAATGGGAAATTCAAGGGC</u> <u>AGAGTCACAATTACCGCCGACAAATCCACTAGCAC</u> <u>AGCCTATATGGAGCTGAGCAGCCTGAGATCTGAGG</u> <u>ACACGGCCGTGTATTACTGTGCAAGAAATGTCTTT</u> <u>GATGGTTACTGGCTTGTCTTACTGGGGCCAGGGAAAC</u> <u>CCTGGTCACCGTCTCCTCAGCTAGCGAATTCTCGA</u>	71
trình tự tín hiệu VH	<u>ATGGACTGGACCTGGAGGATCCTCTTCTTGGTGGC</u> <u>AGCAGCCACAGGAGCCCACTCC</u>	73
B-KV1	<u>GATATCGTGATGACCCAGACTCCACTCTCCCTGCCC</u> <u>GTCACCCCTGGAGAGCCCGCCAGCATTAGCTGCAG</u> <u>GTCTAGCAAGAGCCTCTTGACAGCAATGGCATCA</u> <u>CTTATTTGTATTGGTACCTGCAAAAGCCAGGGCAG</u> <u>TCTCCACAGCTCCTGATTATCAAATGTCCAACCTT</u> <u>GTCTCTGGCGTCCCTGACCGGTTCTCCGGATCCGGG</u> <u>TCAGGCACTGATTTCACACTGAAAATCAGCAGGGT</u> <u>GGAGGCTGAGGATGTTGGAGTTTATTACTGCGCTC</u> <u>AGAATCTAGAACTTCCTTACACCTTCGGCGGAGGG</u> <u>ACCAAGGTGGAGATCAAACGTACGGTG</u>	75
trình tự tín hiệu VH	<u>ATGGACATGAGGGTCCCCGCTCAGCTCCTGGGCCT</u> <u>CCTGCTGCTCTGGTTCCTCAGGTGCCAGGTGT</u>	77

BẢNG 3

CẤU TRÚC	TRÌNH TỰ AXIT AMIN	SEQ ID NO
B-HH1	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSKASGYTFYSWMSWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGRIFPGDGDIDYAOKFOGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	30
B-HH2	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWMNWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGDIDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLTVSS</u>	32
B-HH3	<u>QVOLVOSGAEVKKPGSSVKVSKASGYAFSYSWMNWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGDIDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYLCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LTVSS</u>	34

(tiếp tục)

CAU TRUC	TRÌNH TỰ AXIT AMIN	SEQ ID NO
B-HH4	<u>QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCVSGYAFSYSWMNWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>36</u>
B-HH5	<u>QVOLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWMSWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>38</u>
B-HH6	<u>QVOLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWINWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>40</u>
B-HH7	<u>QVOLVQSGAEVKKPGSSVKVSCASGYAFSYSWISWVR</u> <u>QAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>42</u>
B-HH8	<u>QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTYSWMNWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>44</u>
B-HH9	<u>QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTYSWMNWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>46</u>
B-HL1	<u>QVOLVQSGAEVKKPGASVKVSCASGYTFTYSWMHWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDAQKFOGRVTMTRDT</u> <u>STSTVYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGO</u> <u>GTLVTVSS</u>	<u>48</u>
B-HL2	<u>EVOLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMHWV</u> <u>QOAPGKGLEWMGRIFPGDGDYDAEKFOGRVTITADTS</u> <u>TDIAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>50</u>
B-HL3	<u>EVOLVQSGAEVKKPGATVKISCKVSGYTFTYSWMNWV</u> <u>QOAPGKGLEWMGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADTS</u> <u>TDIAYMELSSLRSEDTAVYYCATNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>52</u>
B-HL4	<u>QMQLVQSGAEVKKTGSSVKVSCASGYTFTYSWMSWV</u> <u>ROAPGQGLEWMGRIFPGDGDYDAQKFOGRVTITADKS</u> <u>TSTAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOG</u> <u>TLVTVSS</u>	<u>54</u>

(tiếp tục)		
CAU TRUC	TRINH TỰ AXIT AMIN	SEQ ID NO
B-HL8	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>56</u>
B-HL10	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFAFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>58</u>
B-HL11	<u>QVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWVGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>60</u>
B-HL12	<u>EVOLVESGAGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>62</u>
B-HL13	<u>EVOLVESGGGVVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>64</u>
B-HL14	<u>EVOLVESGGGLKKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>66</u>
B-HL15	<u>EVOLVESGGGLVKPGSSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>68</u>
B-HL16	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRVSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKSTS</u> <u>TAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGTL</u> <u>VTVSS</u>	<u>70</u>
B-HL17	<u>EVOLVESGGGLVKPGGSLRLSCAASGFTFSYSWMNWVR</u> <u>QAPGKGLEWMGRIIPGDGDTDYNGKFKGRVTITADKST</u> <u>STAYMELSSLRSEDTAVYYCARNVFDGYWLVYWGOGT</u> <u>LVTVSS</u>	<u>72</u>
trình tự tín hiệu VH	<u>MDWTWRILFLVAAATGAHS</u>	<u>74</u>
B-KV1	<u>DIVMTQTPLSLPVTGPGEPAISCRSSKSLHSNGITYLYWY</u> <u>LOKPGOSPOLLIIYOMSNLVSGVPDRFSGSGGTDFTLKIS</u> <u>RVEAEDVGVIYCAQNLELPYTFGGGKVEIKRTV</u>	<u>76</u>
trình tự tín hiệu VH	<u>MDMRVPAQLLGLLLWFPGARC</u>	<u>78</u>

Theo một phương án được ưu tiên khác, sáng chế đề cập đến polynucleotit phân lập chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự axit amin thể hiện trong Fig.1

hoặc Fig.2. Sáng chế còn đề cập đến axit nucleic phân lập chứa trình tự có độ tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự nucleotit thể hiện trong Fig.5 hoặc Fig.6. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến axit nucleic phân lập chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự axit amin có độ tương đồng ít nhất là 80%, 85%, 90%, 95%, 96%, 97%, 98% hoặc 99% với trình tự axit amin trên Fig.5 hoặc Fig.6. Sáng chế cũng bao hàm axit nucleic phân lập chứa trình tự mã hoá polypeptit có trình tự axit amin ở Fig.1, Fig.2, Fig.5 hoặc Fig.6 với các thay thế axit amin bảo toàn.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến vật truyền biểu hiện và/hoặc tế bào chủ chứa một hoặc nhiều polynucleotit phân lập theo sáng chế.

Nói chung, bất kỳ loại tế bào nuôi cấy nào có thể được sử dụng để biểu hiện ABM theo sáng chế. Theo một phương án được ưu tiên, các tế bào tế bào CHO, tế bào BHK, tế bào NSO, tế bào SP2/0, tế bào u tuỷ O, tế bào u tuỷ chuột P3X63, tế bào PER, tế bào PER.C6 hoặc tế bào lai, các tế bào của động vật có vú khác, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào thực vật được sử dụng làm dòng tế bào nền để tạo ra các tế bào chủ được xử lý theo sáng chế.

Hiệu quả điều trị của các ABM theo sáng chế có thể được tăng cường bằng cách tạo ra chúng trong tế bào chủ để biểu hiện hơn nữa polynucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII. Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit thể dung hợp chứa vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú ở Golgi. Theo một phương án được ưu tiên khác, biểu hiện các ABM theo sáng chế trong tế bào chủ để biểu hiện polynucleotit mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII làm cho các ABM có ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và chức năng chất đáp ứng tăng. Vì vậy, theo một phương án, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa (a) axit nucleic phân lập chứa trình tự mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII; và (b) polynucleotit phân lập mã hoá ABM theo sáng chế, như kháng thể dạng khảm, được làm cho có tính của động vật linh trưởng hoặc nhân tính hoá gắn kết với CD20. Theo một

phương án được ưu tiên, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit thể dung hợp chứa vùng xúc tác của GnTIII và vùng định vị Golgi là vùng định vị của manosidaza II. Các phương pháp để tạo ra các polypeptit thể dung hợp này và sử dụng chúng để tạo ra các kháng thể có các chức năng đáp ứng tăng được đề cập đến trong đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời Số 60/495,142, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một phương án được ưu tiên khác, ABM dạng khảm được kháng thể dạng khảm hoặc một đoạn của chúng, có tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể chuột B-LY1. Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, kháng thể dạng khảm chứa Fc người. Theo một phương án được ưu tiên khác, kháng thể được nhân tính hoá hoặc làm cho có tính của động vật linh trưởng.

Theo một phương án, một hoặc một vài polynucleotit mã hoá ABM theo sáng chế có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cấu thành hoặc, theo cách khác, của hệ biểu hiện điều hoà. Các hệ biểu hiện điều hoà được thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn hệ biểu hiện điều hoà bằng tetracyclin, hệ biểu hiện cảm ứng bởi ecdyzon, hệ biểu hiện cắt bằng cánh kiến đỏ, hệ biểu hiện cảm ứng bởi glucocorticoit, hệ gen khởi đầu cảm ứng bởi nhiệt độ, và hệ biểu hiện cảm ứng bởi kim loại. Nếu một vài axit nucleic khác biệt mã hoá ABM theo sáng chế được chứa trong hệ tế bào chủ, thì một số trong các axit này có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cấu thành, trong khi các axit khác được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu điều hoà. Mức biểu hiện tối đa được dự tính là mức cao nhất có thể của mức biểu hiện polypeptit không có tác dụng có hại đáng kể đối với tốc độ sinh trưởng của tế bào, và sẽ được xác định nhờ sử dụng sự thử nghiệm thông thường. Các mức biểu hiện được xác định bằng các phương pháp thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm phép phân tích thẩm tách Tây tính đặc hiệu của kháng thể đối với ABM hoặc tính đặc hiệu kháng thể đối với dấu peptit ngưng tụ với ABM; phép phân tích thẩm tách Bắc. Theo cách khác, polynucleotit có thể được liên kết động với gen báo cáo; mức biểu hiện của ABM dạng khảm có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-Lyl được xác định bằng cách xác định tín hiệu tương quan với mức biểu hiện của gen báo cáo. Gen báo cáo có thể được sao

chép cùng với (các) axit nucleic mã hoá polypeptit thể dung hợp này là phân tử ARN thông tin đơn; các trình tự mã hoá tương ứng của chúng có thể được liên kết hoặc bởi điểm vào ribosom trong (IRES) hoặc bởi gen tăng cường dịch mã không phụ thuộc mũ (CITE). Gen báo cáo có thể được dịch mã cùng với ít nhất một axit nucleic mã hoá ABM dạng khảm có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B- Lyl sao cho chuỗi polypeptit đơn được tạo ra. Các axit nucleic mã hoá các AMB theo sáng chế có thể được liên kết động với gen báo cáo dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu đơn, sao cho axit nucleic mã hoá polypeptit thể dung hợp và gen báo cáo được sao chép vào phân tử ARN được tách intron vào hai phân tử ARN thông tin riêng biệt (mRNA); một trong các ARN thông tin thu được được dịch mã thành protein báo cáo, và ARN thông tin khác được dịch mã vào polypeptit thể dung hợp.

Các phương pháp đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể được sử dụng để cấu trúc các vật truyền biểu hiện chứa trình tự mã hoá của ABM có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-Lyl cùng với các tín hiệu đối chứng phiên mã/dịch mã thích hợp. Các phương pháp đó bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp ADN in vitro, các kỹ thuật tổng hợp và tái tổ hợp in vivo/tái tổ hợp di truyền. Ví dụ, xem các kỹ thuật được mô tả trong tài liệu Maniatis et al., MOLECULAR CLONING A LABORATORY MANUAL, Cold Spring Harbor Laboratory, N. Y. (1989) và Ausubel et al., CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY, Greene Publishing Associates and Wiley Interscience, N. Y (1989).

Các hệ vật truyền biểu hiện trong vật chủ khác nhau có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự mã hoá các ABM theo sáng chế. Tốt hơn nếu, các tế bào động vật có vú được sử dụng làm các hệ tế bào chủ chuyển nhiễm với ADN plasmit tái tổ hợp hoặc các vật truyền biểu hiện ADN cosmid chứa trình tự mã hoá protein quan tâm và trình tự mã hoá polypeptit thể dung hợp. Tốt nhất nếu, các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NSO, các tế bào SP2/0, các tế bào u tủy YO, tế bào u tủy chuột P3X63, tế bào PER, tế bào PER. C6 hoặc tế bào lai, các tế bào động vật có vú khác,

các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào thực vật được sử dụng làm hệ tế bào chủ. Một số ví dụ về hệ biểu hiện và các phương pháp chọn lọc được mô tả trong các tài liệu dưới đây, và đề cập trong: Borth et al., *Biotechnol. Bioen.* 71 (4): 266-73 (2000-2001), trong Werner et al., *Arzneimittelforschung/ Drug Res.* 48 (8): 870-80(1998), trong Andersen and Krummen, *Curr. Op. Biotechnol.* 13: 117-123 (2002), trong Chadd and Chamow, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 188-194 (2001), và trong Giddings, *Curr. Op. Biotechnol.* 12: 450-454 (2001). Theo các phương án khác, các hệ tế bào chủ có nhân điển hình có thể được dự tính, bao gồm các tế bào nấm men biến nạp bằng các vật truyền biểu hiện nấm men tái tổ hợp chứa trình tự mã hoá ABM theo sáng chế, các hệ tế bào côn trùng lây nhiễm bởi các vật truyền biểu hiện tái tổ hợp (ví dụ, baculovirus) chứa trình tự mã hoá ABM dạng khả có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-Lyl; các hệ tế bào thực vật lây nhiễm bởi các vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ, các virus cải hoa lơ dạng khả, CaMV; các virus thuốc lá dạng khả, TMV) hoặc biến nạp bằng các vật truyền biểu hiện plasmid tái tổ hợp (ví dụ, plasmid Ti) chứa trình tự mã hoá ABM theo sáng chế; hoặc các hệ tế bào động vật lây nhiễm bởi các vật truyền biểu hiện virus tái tổ hợp (ví dụ, adenovirus, các virus vaccinia) bao gồm các dòng tế bào được xử lý để chứa các bản sao nhiều lần của ADN mã hoá ABM dạng khả có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-Lyl hoặc được khuếch đại ổn định (CHO/dhfr) hoặc khuếch đại không ổn định trong các nhiễm sắc thể đột biến trội kép (ví dụ, các dòng tế bào chuột). Theo một phương án, vật truyền chứa (các) polynucleotit mã hoá ABM theo sáng chế là đa xistron. Cũng vậy, theo một phương án ABM mô tả ở trên là kháng thể hoặc một đoạn của chúng. Theo một phương án được ưu tiên, ABM là kháng thể được nhân tính hoá.

Đối với các phương pháp theo sáng chế, biểu hiện ổn định nói chung thường được ưu tiên so với biểu hiện chuyển tiếp vì nó thường thu được nhiều kết quả có thể tái tạo hơn và cũng có thể thực hiện theo quy trình sản xuất quy mô lớn hơn. Đúng hơn là nhờ sử dụng các vật truyền biểu hiện chứa các khởi đầu sao chép virus, các tế bào chủ có thể được biến nạp với các axit nucleic mã hoá tương ứng được kiểm soát

bởi các thành phần kiểm soát biểu hiện thích hợp (ví dụ, gen khởi đầu, gen tăng cường, các trình tự, gen kết thúc phiên mã, các điểm polyadenyl hoá, v.v.), và gen đánh dấu có thể chọn lọc. Theo chỉ dẫn đối với ADN lạ, các tế bào đã xử lý có thể được phát triển trong 1-2 ngày trong môi trường giàu, và sau đó chuyển sang môi trường chọn lọc. Gen đánh dấu có thể chọn lọc được trong plasmit tái tổ hợp mang lại tính đề kháng cho quá trình chọn lọc và cho phép chọn lọc các tế bào có plasmit xâm nhập ổn định vào các nhiễm sắc thể của chúng và phát triển để tạo tâm điểm đến lượt mình có thể được tách dòng và nở ra trong dòng tế bào.

Số lượng các hệ chọn lọc có thể được sử dụng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thymidin kinaza chứa các virut ecpet bộ đơn (Wigler et al., Cell 11:223 (1977)), hypoxanthin-guanin phosphoribosyltransferaza (Szybalska & Szybalski, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 48: 2026 (1962)), và các gen adenin phosphoribosyltransferaza (Lowy et al., Cell 22: 817 (1980)), có thể được sử dụng tương ứng trong các tế bào tk-, hgp^rt- hoặc ap^rt-. Ngoài ra, tính đề kháng chất kháng chuyển hoá có thể được sử dụng làm cơ sở để chọn lọc đối với dhfr, nó mang lại tính đề kháng methotrexat (Wigler et al., Natl. Acad. Sci. USA 77: 3567 (1989); O'Hare et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 1527 (1981)); gpt, mang lại tính đề kháng axit mycophenolic (Mulligan & Berg, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 78: 2072 (1981)); neo, mang lại tính đề kháng aminoglycosit G-418 (Colberre-Garapin et al., J. Mol. Biol. 150: 1 (1981)); và hyg^r, mang lại tính đề kháng các gen hygromyxin (Santerre et al., Gene 30: 147 (1984)). Mới đây, các gen có thể chọn lọc khác được mô tả, đó là trpB, nó cho phép các tế bào sử dụng indol thay cho tryptophan; hisD, cho phép các tế bào sử dụng histinol thay cho histidin (Hartman & Mulligan, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 85: 8047 (1988)); hệ glutamin synthaza; và ODC (ornithin decarboxylaza) mang lại tính đề kháng chất ức chế ornithin decarboxylaza, 2-(diflometyl)-DL-ornithin, DFMO (McConlogue, trong: Current Communications in Molecular Biology, Cold Spring Harbor Laboratory ed. (1987)).

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp để cải biến tính chất glycozyl hoá các ABM theo sáng chế mà được tạo ra bởi tế bào chủ, bao gồm biểu hiện trong tế bào chủ này axit nucleic mã hoá ABM theo sáng chế và axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII, hoặc vật truyền chứa các axit nucleic này. Tốt hơn nếu, polypeptit cải biến là IgG hoặc một đoạn của chúng chứa vùng Fc. Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, ABM là kháng thể được nhân tính hoá hoặc một đoạn của chúng.

Các ABM cải biến được tạo ra bởi các tế bào chủ theo sáng chế có ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và/hoặc chức năng tác động tăng do quá trình cải biến. Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, ABM là kháng thể được nhân tính hoá hoặc một đoạn của chúng chứa vùng Fc. Tốt hơn nếu, ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng là sự gắn kết tăng với thụ thể có hoạt tính Fcγ, như thụ thể FcγRIIIa. Tốt hơn nếu chức năng tác động tăng trong một hoặc nhiều nhóm sau đây: tăng tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, tăng sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), tăng tiết xuất xytokin, tăng sự hấp thu kháng nguyên do phức hệ miễn dịch tạo ra nhờ các tế bào thể hiện kháng nguyên, tăng tính gây độc tế bào do Fc tạo ra, tăng sự gắn kết với các tế bào NK, tăng sự gắn kết với các đại thực bào, tăng sự gắn kết với các tế bào nhiều dạng nhân (PMNs), tăng sự gắn kết bạch cầu đơn nhân to, tăng sự liên kết của các kháng thể liên kết đích, tăng sự truyền tín hiệu trực tiếp gây chết tế bào, tăng quá trình phân bào tế bào dạng cây, tăng gây miễn cảm sơ bộ tế bào T.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp để tạo ra ABM theo sáng chế, có các oligosacarit cải biến trong tế bào chủ bao gồm (a) nuôi cấy tế bào chủ được xử lý để biểu hiện ít nhất một axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII trong các điều kiện cho phép quá trình tạo ra ABM theo sáng chế, trong đó polypeptit này có hoạt tính GnTIII được biểu hiện trong một lượng đủ để cải biến oligosacarit trong vùng Fc của ABM đã nêu được tạo ra bởi tế bào chủ này; và (b) phân lập ABM này. Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit thể

dung hợp chứa vùng xúc tác của GnTIII. Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, polypeptit thể dung hợp còn chứa vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú tại Golgi.

Tốt hơn nữa, vùng định vị Golgi là vùng định vị của manosidaza II hoặc GnTI. Theo cách khác, vùng định vị Golgi được chọn từ nhóm gồm có: vùng định vị của manosidaza I, vùng định vị của GnTII, và vùng định vị của fucosyltransferaza nhân 1-6. Các ABM được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế có ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và/hoặc chức năng tác động tăng. Tốt hơn nữa chức năng tác động tăng trong một hoặc nhiều nhóm sau đây: tăng tính gây độc tế bào do Fc tạo ra (bao gồm tăng tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể), tăng sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), tăng tiết xuất xytokin, tăng sự hấp thu kháng nguyên do phức hệ miễn dịch tạo ra nhờ các tế bào thể hiện kháng nguyên, tăng sự gắn kết với các tế bào NK, tăng sự gắn kết với các đại thực bào, tăng sự gắn kết bạch cầu đơn nhân to, tăng sự gắn kết với các tế bào nhiều dạng nhân, tăng sự liên kết của các kháng thể liên kết đích, tăng sự truyền tín hiệu trực tiếp gây chết tế bào, tăng quá trình phân bào tế bào dạng cây, tăng gây miễn cảm sơ bộ tế bào T. Tốt hơn nữa ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng là được nâng lên bằng cách gắn kết với các thụ thể có hoạt tính Fc như FcγRIIIa. Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, ABM là kháng thể được nhân tính hoá hoặc một đoạn của chúng.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến ABM dạng khảm về cơ bản có tính đặc hiệu gắn kết tương tự của kháng thể chuột B-Lyl được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế có tỷ lệ phần oligosacarit cắt đôi tăng ở vùng Fc của polypeptit này. Được dự tính rằng ABM này bao hàm các kháng thể và các đoạn của chúng chứa vùng Fc. Theo một phương án được ưu tiên khác, ABM là kháng thể được nhân tính hoá. Theo một phương án, phần trăm oligosacarit cắt đôi ở vùng Fc của ABM ít nhất là 50%, tốt hơn nữa nếu, ít nhất là 60%, ít nhất là 70%, ít nhất là 80%, hoặc ít nhất là 90%, và tốt nhất nếu ít nhất là 90-95% của oligosacarit tổng. Theo một phương án được khác, ABM được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế có tỷ lệ các oligosacarit không fucosyl hoá tăng ở vùng Fc do quá trình cải biến

oligosacarit của nó bằng các phương pháp theo sáng chế. Theo một phương án, phần trăm các oligosacarit không fucosyl hoá ít nhất là 50%, tốt hơn nếu, ít nhất là 60% đến 70%, tốt nhất nếu ít nhất là 75%. Các oligosacarit không fucosyl hoá có thể là dạng lai hoá hoặc phức hệ. Theo một phương án được ưu tiên, ABM được tạo ra bởi các tế bào chủ và các phương pháp theo sáng chế có tỷ lệ các oligosacarit cắt đôi, không fucosyl hoá tăng ở vùng Fc. Các oligosacarit cắt đôi, không fucosyl hoá có thể hoặc là dạng lai hoá hoặc phức hệ. Đặc biệt, các phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để tạo ra các ABM trong đó ít nhất 15%, tốt hơn nếu ít nhất 20%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 25%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 30%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 35% oligosacarit ở vùng Fc của ABM được cắt đôi, không fucosyl hoá. Các phương pháp theo sáng chế cũng có thể được sử dụng để tạo ra các polypeptit trong đó ít nhất 15%, tốt hơn nếu ít nhất 20%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 25%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 30%, tốt hơn nữa nếu ít nhất là 35% oligosacarit ở vùng Fc của polypeptit là thể lai được cắt đôi không fucosyl hoá.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến ABM dạng khảm về cơ bản có tính đặc hiệu gắn kết tương tự của kháng thể chuột B-Lyl được xử lý để có chức năng tác động tăng và/hoặc ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng, được tạo ra bằng các phương pháp theo sáng chế. Tốt hơn nếu, chức năng tác động tăng là một hoặc nhiều nhiều nhóm sau đây: tăng tính gây độc tế bào do Fc tạo ra (bao gồm tăng tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể), tăng sự thực bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCP), tăng tiết xuất xytokin, tăng sự hấp thu kháng nguyên do phức hệ miễn dịch tạo ra nhờ các tế bào thể hiện kháng nguyên, tăng sự gắn kết với các tế bào NK, tăng sự gắn kết với các đại thực bào, tăng sự gắn kết bạch cầu đơn nhân to, tăng sự gắn kết với các tế bào nhiều dạng nhân, tăng sự truyền tín hiệu trực tiếp gây chết tế bào, tăng sự liên kết của các kháng thể liên kết đích, tăng quá trình phân bào tế bào dạng cây, tăng gây miễn cảm sơ bộ tế bào T. Theo một phương án được ưu tiên, ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng được nâng lên bằng cách gắn kết với thụ thể hoạt hoá Fc, tốt nhất là FcγRIIIa. Theo một phương án được ưu tiên, đoạn kháng thể chứa vùng Fc, hoặc

protein thể dung hợp bao gồm vùng tương đương với vùng Fc của globulin miễn dịch. Theo một phương án được ưu tiên đặc biệt, ABM là kháng thể được nhân tính hoá.

Sáng chế còn đề cập đến các dược phẩm chứa các ABM theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Sáng chế còn đề cập đến việc sử dụng dược phẩm này trong phương pháp để điều trị bệnh ung thư. Đặc biệt, sáng chế còn đề cập đến phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm cung cấp một lượng điều trị hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế.

Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp làm phát sinh và sử dụng các hệ tế bào chủ để tạo ra các glycoform của các ABM theo sáng chế, có ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng, tốt hơn nếu có sự gắn kết với các thụ thể hoạt hoá Fc tăng, và/hoặc có các chức năng tác động tăng, kể cả tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Phương pháp xử lý glyco là phương pháp có thể được sử dụng với các ABM theo sáng chế đã được mô tả chi tiết hơn trong patent Mỹ số 6,602,684, đơn yêu cầu cấp patent Mỹ tạm thời số 60/441,307 và WO 2004/065540, toàn bộ các tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Các ABM theo sáng chế có thể được xử lý glyco theo cách khác để làm giảm các gốc fucoza ở vùng Fc theo các kỹ thuật được đề cập trong EP 1176195 A1, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Quá trình phát sinh các dòng tế bào để tạo ra các protein có kiểu glycozyl hoá thay đổi

Sáng chế đề xuất các hệ biểu hiện tế bào chủ để tạo ra các ABM theo sáng chế có các kiểu glycozyl hoá cải biến. Đặc biệt, sáng chế đề xuất các hệ tế bào chủ để tạo ra các glycoform của các ABM theo sáng chế có giá trị điều trị được cải thiện. Vì vậy, sáng chế đề xuất các hệ biểu hiện tế bào chủ được chọn lọc hoặc xử lý để biểu hiện polypeptit có hoạt tính GnTIII. Theo một phương án, polypeptit có hoạt tính GnTIII là polypeptit thể dung hợp chứa vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú tại

Golgi không tương đồng. Đặc biệt, các hệ biểu hiện tế bào chủ này có thể được xử lý để chứa phân tử axit nucleic mã hoá polypeptit có GnTIII, liên kết linh hoạt với hệ gen khởi đầu cấu thành hoặc điều hoà.

Theo một phương án đặc biệt, sáng chế đề xuất tế bào chủ được xử lý để biểu hiện ít nhất một axit nucleic mã hoá polypeptit thể dung hợp có hoạt tính GnTIII và chứa vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú tại Golgi không tương đồng. Theo một khía cạnh, tế bào chủ được xử lý bằng phân tử axit nucleic chứa ít nhất một gen mã hoá polypeptit thể dung hợp có hoạt tính GnTIII và chứa vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú tại Golgi không tương đồng.

Nói chung, bất kỳ loại dòng tế bào nuôi cấy nào, kể cả các dòng tế bào nêu trên, có thể được sử dụng làm cơ sở để xử lý các dòng tế bào chủ theo sáng chế. Theo một phương án được ưu tiên, các tế bào CHO, các tế bào BHK, các tế bào NSO, các tế bào SP2/0, các tế bào u tuỷ YO, tế bào u tuỷ chuột P3X63, tế bào PER, tế bào PER. C6 hoặc tế bào lai, các tế bào động vật có vú khác, các tế bào nấm men, các tế bào côn trùng, hoặc các tế bào thực vật được sử dụng làm dòng tế bào cơ sở để tạo ra các tế bào chủ được xử lý theo sáng chế.

Sáng chế cũng dự tính bao gồm bất kỳ tế bào chủ được xử lý nào biểu hiện polypeptit có hoạt tính GnTIII, kể cả polypeptit thể dung hợp chứa vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú tại Golgi không tương đồng.

Một hoặc một vài axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII có thể được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu cấu thành hoặc, theo cách khác của hệ biểu hiện điều hoà. Hệ này là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm cả hệ nêu trên. Nếu một vài axit nucleic mã hoá các polypeptit thể dung hợp có hoạt tính GnTIII và chứa vùng định vị Golgi của polypeptit cư trú tại Golgi không tương đồng nằm trong hệ tế bào chủ, thì một số trong các axit nucleic này được biểu hiện dưới sự kiểm soát gen khởi đầu cấu thành, trong khi các loại khác được biểu hiện dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu điều hoà. Các mức biểu hiện các polypeptit thể

dung hợp có hoạt tính GnTIII được xác định bằng các phương pháp thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm phép phân tích thẩm tách Tây, phép phân tích thẩm tách Bắc, phân tích biểu hiện gen báo cáo hoặc xác định hoạt tính GnTIII. Theo cách khác, lectin có thể được sử dụng để liên kết với các sản phẩm sinh tổng hợp của GnTIII, ví dụ lectin E4-PHA. Theo cách khác, thử nghiệm chức năng xác định mức gắn kết thụ thể Fc tăng hoặc chức năng tác động tăng do các kháng thể gây ra được tạo ra bằng các tế bào được xử lý bằng axit nucleic mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII có thể được sử dụng.

Nhận dạng tác nhân chuyển nhiễm (Transfectants) hoặc biến nạp (Transformants) để biểu hiện protein có kiểu Glycozyl hoá cải biến

Các tế bào chủ chứa trình tự mã hoá ABM dạng khảm có tính đặc hiệu về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-Lyl và biểu hiện các sản phẩm gen có hoạt tính sinh học có thể được nhận dạng bằng ít nhất bốn phương pháp chung; (a) lai hoá ADN-ADN hoặc ADN-ARN; (b) sự có mặt hoặc vắng mặt các chức năng của gen “đánh dấu”; (c) ước lượng mức phiên mã như được xác định bằng sự biểu hiện của ARN thông tin tương ứng phiên mã trong tế bào chủ; và (d) dò sản phẩm gen như được xác định bằng thử nghiệm miễn dịch hoặc bằng hoạt tính sinh học.

Theo phương pháp thứ nhất, sự có mặt của trình tự mã hoá ABM dạng khảm có tính đặc hiệu về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-Lyl và trình tự mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII có thể được dò bằng quá trình lai hoá ADN-ADN hoặc ADN-ARN nhờ sử dụng các mẫu lai thử chứa các trình tự nucleotit tương đồng với các trình tự mã hoá tương ứng, hoặc tương ứng các phần của các dẫn xuất của chúng.

Theo phương pháp thứ hai, vật truyền biểu hiện tái tổ hợp/hệ vật chủ có thể được nhận dạng và chọn lọc dựa vào sự có mặt hoặc không có một số chức năng của gen “đánh dấu” (ví dụ, hoạt tính thymidin kinaza, tính đề kháng với các kháng thể, tính đề kháng với methotrexat, quá trình kiểu biến nạp, quá trình hình thành thể nút

trong baculovirut, v.v..). Ví dụ, nếu trình tự mã hoá của ABM theo sáng chế, hoặc một đoạn của chúng, và trình tự mã hoá của polypeptit có hoạt tính GnTIII được xen đoạn trong trình tự gen đánh dấu của vật truyền, thì các chất tái tổ hợp chứa các trình tự mã hoá tương ứng có thể được nhận dạng nhờ không có chức năng của gen đánh dấu. Theo cách khác, gen đánh dấu có thể được thay thế cái trước cái sau bằng các trình tự mã hoá dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu tương tự hoặc khác biệt được sử dụng để kiểm soát quá trình biểu hiện của các trình tự mã hoá. Biểu hiện của gen đánh dấu trong khi đáp ứng tạo ra quá trình cảm ứng hoặc chọn lọc biểu thị quá trình biểu hiện của trình tự mã hoá ABM theo sáng chế và trình tự mã hoá của polypeptit có hoạt tính GnTIII.

Theo phương pháp thứ ba, hoạt tính phiên mã đối với vùng mã hoá của ABM theo sáng chế, hoặc một đoạn của chúng, và trình tự mã hoá của polypeptit có hoạt tính GnTIII có thể được đánh giá bằng các thử nghiệm lai hoá. Ví dụ, ARN có thể được phân lập bằng phân tích bằng phép thấm tách Nam nhờ sử dụng mẫu lai thử tương đồng với các trình tự mã hoá của ABM theo sáng chế, hoặc một đoạn của chúng, và trình tự mã hoá polypeptit có hoạt tính GnTIII hoặc các phần đặc biệt của chúng. Theo cách khác, tất cả các axit nucleic của tế bào chủ có thể được chiết và thử nghiệm để lai hoá với các mẫu lai thử này.

Theo phương pháp thứ tư, biểu hiện của các sản phẩm protein có thể được đánh giá bằng miễn dịch, chẳng hạn bằng các phép thấm tách Tây, các thử nghiệm miễn dịch như miễn dịch phóng xạ-kết tủa, các thử nghiệm liên kết enzym và các thử nghiệm tương tự. Thử nghiệm cuối cùng về độ đạt được của hệ biểu hiện, nhưng có bao gồm việc dò các sản phẩm gen có hoạt tính sinh học.

Tạo ra và sử dụng các ABM có chức năng tác động tăng bao gồm tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể

Theo các phương án được ưu tiên, sáng chế đề xuất các glycoform của các ABM dạng khảm có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-

Lyl và có chức năng tác động tăng bao gồm tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể. Việc xử lý bằng quá trình glycozyl hoá các kháng thể được mô tả trước đó. Ví dụ, xem patent Mỹ số 6,602, 684, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Các thử nghiệm lâm sàng về các kháng thể đơn dòng không liên kết (mAb) để điều trị một số loại bệnh ung thư mới đây đã thu được các kết quả đáng khích lệ. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12 : 223-25 (1997); Deo et al., *Immunology Today* 18: 127 (1997). IgG1 dạng khảm, không liên kết đã được thừa nhận đối với u lympho loại thấp hoặc u lympho không phải ung thư tế bào B. Dillman, *Cancer Biother. & Radiopharm.* 12 : 223-25 (1997), trong khi mAb không liên kết khác, các khối u vú dạng rắn đích IgG1 được nhân tính hoá, cũng thể hiện các kết quả triển vọng trong các thử nghiệm lâm sàng pha III. Deo et al., *Immunology Today* 18: 127 (1997). Các kháng nguyên của hai mAb được biểu hiện cao trong các tế bào khối u tương ứng của chúng và sự phá huỷ các khối u hữu hiệu do các kháng thể tạo ra nhờ các tế bào tác động in vitro và in vivo. Ngược lại, nhiều mAb không liên kết khác với các đặc tính của khối u nhỏ có thể không gây ra các chức năng tác động có hiệu lực đủ để sử dụng lâm sàng. Frost et al., *Cancer* 80: 317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19: 184-91 (1996). Đối với một số mAb trong các mAb yếu hơn, liệu pháp cytokin bổ sung hiện nay được thử nghiệm. Quá trình bổ sung các cytokin có thể kích thích tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) bằng cách làm tăng hoạt tính và số lượng các lympho bào tuần hoàn. Frost et al., *Cancer* 80: 317-33 (1997); Surfus et al., *J. Immunother.* 19: 184-91 (1996). ADCC, sự tấn công sinh tan các tế bào đích-kháng thể, được tạo ra nhờ sự liên kết các thụ thể bạch cầu với vùng không đổi (Fc) của các kháng thể. Deo et al., *Immunology Today* 18: 127 (1997).

Phương pháp khác, nhưng không phải là bổ sung, để làm tăng hoạt tính ADCC của các IgG1 không liên kết sẽ xử lý vùng Fc của kháng thể. Các nghiên cứu xử lý protein chứng tỏ rằng các FcγR tương tác với vùng khớp bản lề của vùng IgG CH2.

Lund et al., J. Immunol. 157: 4963-69 (1996). Tuy nhiên, việc gắn kết Fc γ R cũng cần sự có mặt của oligosacarit gắn kết đồng hoá trị tại vị trí bảo toàn Asn 297 ở vùng CH2. Lund et al., J. Immunol. 157: 4963-69 (1996); Wright and Morrison, Trends Biotech. 15: 26-31 (1997), đề xuất rằng hoặc oligosacarit và polypeptit cả hai tham gia trực tiếp vào điểm tương tác hoặc rằng oligosacarit cần thiết để duy trì cấu tạo CH2 polypeptit có hoạt tính. Vì vậy, quá trình cải biến cấu trúc oligosacarit có thể được thăm dò như là phương pháp làm tăng ái lực tương tác.

Phân tử IgG mang hai oligosacarit liên kết N ở vùng Fc của nó, một oligosacarit trên từng chuỗi nặng. Đối với bất kỳ glycoprotein nào, kháng thể được tạo ra như là một chủng loại gồm các glycoform có chung một khung chính polypeptit nhưng có các ligosacarit khác nhau gắn với các điểm glycozyl hoá. Thông thường oligosacarit được thấy ở vùng Fc của IgG huyết thanh là loại phức hệ hai râu (Wormald et al., Biochemistry 36: 130-38 (1997), với mức axit sialic ở cuối và N-acetylglucosamin (GlcNAc) thấp và mức độ có thể biến đổi của galactosyl hoá cuối cùng và fucosyl hoá nhân. Một số nghiên cứu đề xuất rằng cấu trúc hydrat cacbon rất nhỏ cần thiết để liên kết Fc γ R nằm trong nhân oligosacarit. Lund et al., J. Immunol. 157: 4963-69 (1996).

Các dòng tế bào thu được từ chuột hoặc chuột đồng được sử dụng trong công nghiệp và lý thuyết tạo ra các mAb điều trị không liên kết thường gắn với các yếu tố xác định oligosacarit cần thiết với các điểm Fc. Không có các IgG biểu hiện trong các dòng tế bào đó, tuy nhiên, GlcNAc cắt đôi được thấy với các lượng nhỏ trong các IgG huyết thanh. Lifely et al., Glycobiology 318: 813-22 (1995). Ngược lại, mới đây đã quan sát được rằng IgG1 nhân tính hoá, được tạo ra từ u tuỷ chuột (CAMPATH-1H) mang GlcNAc cắt đôi ở một số glycoform của nó. Lifely et al., Glycobiology 318: 813-22 (1995). Kháng thể thu được từ tế bào chuột đạt tới hoạt tính in vitro ADCC tối đa tương tự như các kháng thể CAMPATH-1H được tạo ra trong các dòng tế bào chuẩn, nhưng ở nồng độ kháng thể thấp hơn đáng kể.

Kháng nguyên CAMPATH thường có mặt ở các mức cao trong các tế bào u lympho, và mAb dạng khảm này có hoạt tính ADCC cao trong tình trạng thiếu GlcNAc cắt đôi. Lifely et al., *Glycobiology* 318: 813-22 (1995). Trong quá trình glycozyl hoá liên kết tại N, GlcNAc được thêm vào nhờ GnTIII. Schachter, *Biochem. Cell Biol.* 64: 163-81 (1986).

Các nghiên cứu trước đó sử dụng dòng tế bào CHO được tạo ra bằng kháng thể đơn, dòng tế bào này được xử lý trước để biểu hiện, theo cách điều hòa bên ngoài, các mức khác nhau của enzym chứa gen GnT III tách dòng (Umana, P., et al., *Nature Biotechnol.* 17: 176-180 (1999)). Phương pháp này lần đầu tiên củng cố mối tương quan chặt chẽ giữa quá trình biểu hiện GnTIII và hoạt tính ADCC của kháng thể cải biến. Vì vậy, sáng chế sẽ bao gồm kháng thể dạng khảm, tái tổ hợp hoặc một đoạn của chúng với tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể chuột B-Lyl, có quá trình glycozyl hoá biến đổi nhờ hoạt tính GnTIII tăng. Hoạt tính GnTIII tăng dẫn đến gia tăng tỷ lệ phần trăm oligosacarit cắt đôi, cũng như giảm tỷ lệ phần trăm các gốc fucoza, ở vùng Fc của ABM. Kháng thể này, hoặc một đoạn của chúng, có ái lực gắn kết thụ thể Fc tăng và chức năng tác động tăng. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến đoạn kháng thể và các protein thể dung hợp chứa vùng tương đương với vùng Fc của các globulin miễn dịch.

Các ứng dụng điều trị của các ABM được tạo ra theo các phương pháp của sáng chế

Các ABM theo sáng chế có thể được sử dụng riêng rẽ để đạt được mục đích và giết chết các tế bào khối u in vivo. Các ABM cũng có thể được sử dụng kết hợp với tác nhân điều trị thích hợp để điều trị caxinom ở người. Ví dụ, các ABM có thể được sử dụng kết hợp với các phương pháp điều trị thông thường hoặc chuẩn như liệu pháp hoá học, liệu pháp bức xạ hoặc có thể kết hợp hoặc liên kết với thuốc điều trị, hoặc độc tố, cũng như lymphokin hoặc nhân tố sinh trưởng ức chế khối u, để phân phối tác nhân điều trị đến vị trí caxinom. Các thể tiếp hợp chứa các ABM theo sáng chế có ý nghĩa quan trọng hàng đầu là (1) các độc tố miễn dịch (các thể tiếp hợp chứa

ABM và gốc độc tế bào) và (2) các ABM đánh dấu (ví dụ, đánh dấu phóng xạ, đánh dấu bằng enzym, hoặc đánh dấu bằng chất có huỳnh quang) trong đó chất đồng vị đánh dấu được sử dụng làm phương tiện để nhận dạng các phức hệ miễn dịch bao gồm ABM đánh dấu. Các ABM cũng có thể được sử dụng để kích thích phân giải nhờ quy trình bổ trợ tự nhiên, và để tương tác với các tế bào có độc tố phụ thuộc kháng thể thường có mặt.

Gốc độc tố của độc tố miễn dịch có thể là dược chất có độc tố hoặc độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn hoặc thực vật, hoặc phần có hoạt tính enzym ("chuỗi A") của độc tố này. Các độc tố có hoạt tính enzym và các phần của chúng được sử dụng là chuỗi gây bệnh bạch hầu A, các phần có hoạt tính không gắn kết của độc tố gây bệnh bạch cầu, chuỗi ngoại độc tố (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modecxin A, alpha-sarcin, các *Aleurites fordii* protein, các dianthin protein, các *Phytolacca americana* protein (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế *momordica charantia*, curcin, crocin, chất ức chế *sapaonaria officinalis*, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomycin, và enomycin. Theo một phương án khác, các ABM được kết hợp với các dược chất chống ung thư phân tử nhỏ. Thể tiếp hợp của ABM và các gốc độc tế bào được tạo ra nhờ sử dụng các chất kết hợp protein chức năng kép khác nhau. Các ví dụ về các chất phản ứng này là SPDP, IT, các chất dẫn xuất chức năng kép của các imit este như dimetyl adipimidat HCl, các este hoạt tính như disuxinimidyl suberat, aldehyt như glutaraldehyt, các hợp chất azido kép như bis(p-azidobenzoyl)hexandiamin, các chất dẫn xuất diazoni kép bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin, diisoxyanat như tolylen 2,6-diisoxyanat, và các hợp chất flo hoạt tính kép như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen. Phần tan của độc tố có thể được liên kết với đoạn Fab của các ABM. Các độc tố thích hợp bổ sung là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, như được chứng minh trong, ví dụ trong Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2002/0128448, toàn bộ tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án, ABM dạng khảm, được xử lý glyco có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-Lyl, được kết hợp với chuỗi ricin A. Thuận lợi nhất nếu, chuỗi ricin A được khử glycozyl hoá và được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp. Phương pháp thuận tiện để tạo ra độc tố miễn dịch ricin được mô tả trong tài liệu Vitetta et al., Science 238, 1098 (1987), tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Khi được sử dụng để giết các tế bào ung thư ở người in vitro cho các mục đích chẩn đoán, các thể tiếp hợp thường sẽ được thêm vào môi trường nuôi cấy tế bào ở nồng độ ít nhất khoảng là 10nM. Chế phẩm và kiểu sử dụng in vitro không bị giới hạn. Các chế phẩm nước tương thích với môi trường nuôi cấy hoặc tiêm truyền sẽ thường được sử dụng. Tính gây độc tế bào có thể được nghiên cứu bằng các kỹ thuật thông thường để xác định sự có mặt hoặc mức độ ung thư.

Như thảo luận ở trên, được chất phóng xạ có độc tính để điều trị bệnh ung thư có thể được tạo ra bằng cách kết hợp chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ (ví dụ, I, Y, Pr) với ABM dạng khảm, được xử lý glyco có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự của kháng thể chuột B-Lyl. Thuật ngữ "gốc độc tố" như được sử dụng ở đây sẽ bao gồm các chất đồng vị này.

Theo một phương án khác, các liposom được nạp được chất có độc tính và các liposom được bao bằng các ABM theo sáng chế. Vì có nhiều phân tử CD20 trên bề mặt của tế bào ác tính B, nên phương pháp này cho phép phân phối các lượng lớn được chất tới kiểu tế bào đúng.

Các kỹ thuật để kết hợp các tác nhân điều trị này với các kháng thể là đã biết rõ (ví dụ xem tài liệu Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", trong Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", trong Controller Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody

Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", trong *Monoclonal Antibodies '84: Biological And Clinical Applications*, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506(1985); và Thorpe et al., "The Preparation And Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", *Immunol. Rev.*, 62: 119-58 (1982)).

Các ứng dụng điều trị khác đối với các ABM theo sáng chế bao gồm kết hợp hoặc liên kết, ví dụ bằng các kỹ thuật tái tổ hợp ADN, với enzym có thể chuyển hoá tiền dược chất thành dược chất có độc tính và sử dụng thể tiếp hợp kháng thể-enzym đó kết hợp với tiền dược chất để chuyển hoá tiền dược chất thành tác nhân có độc tính tại vị trí khối u (ví dụ xem, Senter et al., "Anti-Tumor Effects of Antibody-alkaline Phosphatase", *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 85: 4842-46 (1988); "Enhancement of the in vitro and in vivo Antitumor Activities of Phosphorylated Mitocycin C and Etoposide Derivatives by Monoclonal Antibody-Alkaline Phosphatase Conjugates", *Cancer Research* 49: 5789-5792 (1989); và Senter, "Activation of Prodrugs by Antibody-Enzyme Conjugates: A New Approach to Cancer Therapy," *FASEB J.* 4: 188-193 (1990)).

Ngoài ra việc sử dụng điều trị đối với các ABM theo sáng chế bao gồm, sử dụng, hoặc không kết hợp, với sự có mặt của nhóm bổ sung, hoặc như là một phần của kháng thể-dược chất hoặc thể tiếp hợp kháng thể-độc tố, để loại bỏ các tế bào khối u khỏi tuỷ xương của các bệnh nhân ung thư. Theo phương pháp này, tuỷ xương tự thể có thể được làm sạch ex vivo bằng cách xử lý bằng kháng thể và tuỷ xương được truyền lại cho bệnh nhân [ví dụ xem tài liệu Ramsay et al., "Bone Marrow Purging Using Monoclonal Antibodies", *J. Clin. Immunol.*, 8 (2): 81-88 (1988)].

Ngoài ra, dự tính rằng sáng chế sẽ bao gồm độc tố miễn dịch mạch đơn chứa các vùng gắn kết kháng nguyên để cho tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự như của kháng thể chuột B-Lyl (ví dụ, các polypeptit bao gồm các CDR của kháng thể chuột B-Lyl) và còn bao gồm polypeptit độc tố. Các độc tố miễn dịch mạch đơn theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị caxinom in vivo.

Sáng chế đề xuất phương pháp để giết có chọn lọc các tế bào khối u biểu hiện CD20. Phương pháp này bao gồm cho thể tiếp hợp miễn dịch (ví dụ, độc tố miễn dịch) theo sáng chế phản ứng với các tế bào khối u. Các tế bào khối u này có thể là từ caxinom ở người.

Ngoài ra, sáng chế còn đề xuất phương pháp điều trị các caxinom (ví dụ, các caxinom ở người) in vivo. Phương pháp này bao gồm cung cấp cho đối tượng một lượng điều trị hữu hiệu của dược phẩm chứa ít nhất một trong các thể tiếp hợp miễn dịch (ví dụ, độc tố miễn dịch) theo sáng chế.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp để điều trị các rối loạn tăng sinh tế bào B, cũng như bệnh tự miễn dịch được tạo ra trong toàn bộ hoặc một phần bởi các kháng thể tự miễn gây bệnh, dựa vào sự suy kiệt tế bào B bao gồm cung cấp một lượng điều trị hữu hiệu của ABM theo sáng chế cho đối tượng là người cần điều trị. Theo một phương án được ưu tiên, ABM là kháng thể kháng CD20 được xử lý glyco có tính đặc hiệu gắn kết về cơ bản tương tự với tính đặc hiệu gắn kết của kháng thể chuột B-Lyl. Theo một phương án được ưu tiên khác, kháng thể được nhân tính hoá. Các ví dụ về các bệnh hoặc các rối loạn tự miễn dịch bao gồm, nhưng không giới hạn ở, giảm lượng tiểu cầu do miễn dịch gây ra, như ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát cấp tính và ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát mãn tính, viêm da cơ, múa giật Sydenham, viêm thận ban đỏ, bệnh thấp khớp cấp, hội chứng đa tuyến, ban xuất huyết Henoch-Schonlein, viêm thận sau liên cầu khuẩn, ban đỏ nốt, viêm động mạch Takayasu, bệnh Addison, ban đỏ đa dạng, viêm đa động mạch hờn, viêm đốt sống dạng thấp, hội chứng Goodpasture, viêm mạch tạo huyết nghẽn, xơ gan mật sơ cấp, viêm tuyến giáp Hashimoto, nhiễm độc do tuyến giáp, viêm gan hoạt động mãn tính, viêm đa cơ/viêm da-cơ, viêm đa sụn, *pamphigus vulgaris*, bệnh u hạt Wegener, bệnh thận màng, xơ cứng cột bên teo cơ, liệt toàn thể tuần tiến, đau nhiều cơ, thiếu máu ác tính, viêm phế nang xơ hoá và viêm thận-tiểu cầu tiến triển nhanh, đáp ứng viêm như các bệnh viêm da bao gồm bệnh vẩy nến và chứng viêm da (ví dụ viêm da dị ứng); xơ cứng và xơ cứng toàn thân; các đáp ứng có liên đến bệnh viêm

ruột (như bệnh Crohn và viêm ruột kết mạn loét); hội chứng suy hô hấp cấp (bao gồm hội chứng suy hô hấp cấp ở người trưởng thành; ARDS); viêm da; viêm màng não; viêm não; viêm màng mạch nhỏ; viêm ruột kết; viêm thận-tiểu cầu; các bệnh dị ứng như eczema và hen và các bệnh khác có liên quan đến sự thâm nhiễm các tế bào T và các đáp ứng viêm mãn tính; xơ vữa động mạch; thiếu dính bám bạch cầu; viêm đa khớp dạng thấp; luput ban đỏ toàn thân (SLE); đái tháo đường (ví dụ đái tháo đường Typ 1 hoặc đái tháo đường phụ thuộc insulin); bệnh xơ cứng rải rác; hội chứng Reynaud; viêm tuyến giáp tự miễn dịch; viêm não tuỷ dị ứng; hội chứng Sorgen; bệnh tiểu đường bắt đầu mạnh mẽ tuổi vị thành niên; và các đáp ứng miễn dịch có liên quan đến cấp tính và tăng nhạy cảm chậm do các cytokin và lympho bào T gây ra thường được thấy ở bệnh lao, bệnh sarcoid, viêm đa cơ, bệnh u hạt và viêm mạch; không có kinh nguyệt ác tính (bệnh Addison); các bệnh có liên quan đến xuyên mạch của bạch cầu; rối loạn viêm hệ thần kinh trung ương (CNS); hội chứng thương tổn nhiều cơ quan; thiếu máu tan huyết (bao gồm, nhưng không giới hạn ở cryoglobulin huyết hoặc thiếu máu dương tính Coombs); bệnh nhược cơ năng; các bệnh do phức hệ kháng nguyên-kháng thể gây ra; bệnh màng nền kháng tiểu cầu; hội chứng kháng phospholipit; viêm dây thần kinh dị ứng; bệnh Graves; hội chứng nhược cơ Lambert-Eaton; bệnh pemphigut; pemphigut; bệnh đa nội tiết tự miễn dịch; bệnh Reiter; hội chứng cứng người (stiff-man); bệnh Behcet; viêm động mạch tế bào khổng lồ; viêm thận phức hệ miễn dịch; bệnh thận IgA; bệnh đa thần kinh IgM; ban xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch (ITP) hoặc giảm lượng tiểu cầu tự miễn dịch. Theo khía cạnh này của sáng chế, các ABM theo sáng chế được sử dụng để làm suy kiệt máu của các tế bào B trong khoảng thời gian dài.

Theo thông lệ của sáng chế này, đối tượng có thể là người, ngựa, lợn, bò, chuột, chó, mèo, và các loài chim. Các loài động vật máu nóng khác cũng nằm trong sáng chế này.

Mục đích của sáng chế còn là đề xuất các phương pháp để ức chế sự phát triển của các tế bào khối u ở người, điều trị khối u ở đối tượng và điều trị loại tăng sinh ở

đối tượng. Các phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần điều trị sử dụng một lượng hữu hiệu của dược phẩm theo sáng chế.

Vì vậy, hiển nhiên là sáng chế bao hàm dược phẩm, các hỗn hợp và các phương pháp để điều trị caxinom ở người, như u lympho tế bào B. Ví dụ, sáng chế bao gồm các dược phẩm được sử dụng để điều trị các caxinom bao gồm một lượng dược phẩm hữu hiệu chứa kháng thể theo sáng chế và chất mang dược dụng.

Các dược phẩm chứa ABM theo sáng chế có thể được cung cấp theo cách cách sử dụng thông thường bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng trong tĩnh mạch, trong bụng, sử dụng qua đường miệng, trong mạch bạch huyết hoặc sử dụng trực tiếp trong khối u. Ưu tiên là sử dụng trong tĩnh mạch.

Theo một khía cạnh của sáng chế, các chế phẩm điều trị chứa các ABM theo sáng chế được bào chế để cất giữ bằng cách trộn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn với các chất mang dược dụng tùy ý, các tá dược hoặc các chất làm ổn định (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), dưới dạng các chế phẩm đông khô nhanh hoặc các dung dịch nước. Các chất mang, tá dược, hoặc các chất làm ổn định có thể chấp nhận được là không gây độc cho người nhận ở các liều và các nồng độ đã sử dụng, và bao gồm các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và metionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua, benzetoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn 10gốc); các protein, như huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, các disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc các dextrin; các chất chelat hoá như EDTA; đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion dòng ngược tạo

muối như natri; các phức chất kim loại (ví dụ, các chất phức Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như TWEENTM, PLURONICS hoặc polyetylen glycol (PEG).

Các chế phẩm kháng CD20 ví dụ được mô tả trong WO98/56418, được đưa vào đây bằng cách viện dẫn. Công bố này mô tả chế phẩm đa liều dạng lỏng chứa rituximab 40mg/mL, axetat 25mM, trehaloza 150mM, rượu benzylic 0,9%, polysorbat 20 0,02% ở độ pH=5,0 có thời hạn sử dụng tối thiểu là 2 năm khi lưu giữ ở 2-8°C. Chế phẩm kháng CD20 khác được quan tâm chứa 10mg/mL rituximab trong 9,0mg/mL natri clorua, 7,35mg/mL natri xitrat dihydrat, 0,7mg/mL polysorbat 80, và nước cất để tiêm truyền, độ pH=6,5. Trong sáng chế, RITUXAN® sẽ được thay thế bằng ABM theo sáng chế.

Các chế phẩm đông khô nhanh thích ứng để tiêm dưới da được mô tả trong WO97/04801. Các chế phẩm đông khô nhanh này có thể được tái tạo bằng chất pha loãng thích hợp tạo ra nồng độ protein cao và chế phẩm tái tạo có thể được sử dụng dưới da cho động vật có vú cần được điều trị ở đây.

Chế phẩm ở đây cũng có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất khi cần thiết cho chỉ định điều trị đặc biệt, tốt hơn nếu các hoạt chất đó có các hoạt tính bổ sung mà không có tác động bất lợi cho nhau. Ví dụ, có thể mong muốn đề xuất thêm chất độc tế bào, tác nhân liệu pháp hoá học, cytokin hoặc tác nhân ức chế miễn dịch (ví dụ, một trong các chất đó có tác động đến các tế bào T, như cyclosporin hoặc kháng thể gắn kết với các tế bào T, chẳng hạn một chất đó gắn kết với LFA-1). Lượng hữu hiệu của các tác nhân khác đó tùy thuộc vào lượng chất đối kháng có mặt trong chế phẩm, loại bệnh hoặc rối loạn hoặc điều trị, và các nhân tố khác đã thảo luận ở trên. Các tác nhân này thường được sử dụng ở các liều như nhau và với cách sử dụng như được sử dụng trước đó hoặc khoảng từ 1 đến 99% các liều lượng đã sử dụng trước đây.

Các hoạt chất cũng có thể được giữ trong các vi nang đã được bào chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật sinh giọt hoặc bằng quá trình polyme hoá bề mặt, chẳng hạn các vi

nang hydroxymetylxenluloza hoặc gelatin và các vi nang poly-(metylmetylacrylat), tương ứng trong các hệ keo phân phối thuốc (ví dụ, các liposom, các vi cầu albumin, các vi nhũ tương, các hạt nano và các nang nano) hoặc các nhũ tương lớn. Các kỹ thuật này được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Các chế phẩm giải phóng kéo dài có thể được bào chế. Các ví dụ về các chế phẩm giải phóng kéo dài bao gồm các chất nền bán thấm của các polyme kỵ nước chứa chất đối kháng, các chất nền này dưới dạng các vật có hình dạng, ví dụ, màng mỏng, hoặc các vi nang. Các ví dụ về các chất nền giải phóng kéo dài bao gồm các polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyetyl-metylacrylat), hoặc poly(rượu vinylic)), polylactit (Patent Mỹ Số 3,773,919), các copolyme của axit L-glutamic và γ -etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không thể thoái biến, axit lactic-các copolyme của axit glycolic như LUPRON DEPOT™ (các vi cầu có thể tiêm truyền tạo thành axit lactic-các copolyme của axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D- (-)-3-hydroxybutyric.

Các chế phẩm cần sử dụng để sử dụng in vivo phải là vô trùng. Điều này được thực hiện dễ dàng nhờ lọc qua các màng lọc tiệt trùng.

Các chế phẩm theo sáng chế có thể có các dạng liều lượng khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, dung dịch lỏng hoặc huyền phù, các viên nén, viên tròn, bột, viên thuốc đạn, các vi nang polyme hoặc các tiểu vi nang, các liposome, và các dung dịch có thể tiêm truyền hoặc không nóng chảy. Dạng được ưu tiên tùy thuộc vào cách sử dụng và ứng dụng điều trị.

Tốt hơn là các dược phẩm theo sáng chế cũng bao gồm các chất mang dược dụng thông thường và các tá dược đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật như albumin huyết thanh người, các chất trao đổi ion, alumin, lexitin, các chất đệm như phosphat, glyxin, axit sorbic, kali sorbat, và các muối hoặc các chất điện phân như protamin sulfat.

Cách sử dụng và chế độ liều hữu hiệu nhất đối với các dược phẩm theo sáng chế tùy thuộc vào mức nghiêm trọng và tiến trình bệnh, sức khoẻ bệnh nhân và đáp ứng điều trị và quyết định của bác sỹ điều trị. Vì vậy, liều lượng dược phẩm sẽ được chuẩn độ cho từng bệnh nhân. Tuy nhiên, liều hữu hiệu của các dược phẩm theo sáng chế thường sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 2000mg/kg.

Các phân tử được mô tả ở đây có các dạng liều lượng khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các dạng dung dịch hoặc huyền phù, các viên nén, viên tròn, bột, viên thuốc đạn, các vi nang polyme hoặc các vi nang, các liposom, và các dung dịch có thể tiêm truyền hoặc không nóng chảy. Dạng được ưu tiên tùy thuộc vào cách sử dụng và ứng dụng điều trị.

Dược phẩm chứa ABM theo sáng chế sẽ được bào chế, định liều, và cung cấp theo cách phù hợp với phòng mạch của bác sỹ tốt. Các nhân tố để xem xét trong phạm vi này bao gồm bệnh hoặc rối loạn cụ thể cần được điều trị, động vật có vú cụ thể cần được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây ra bệnh hoặc rối loạn, vị trí phân phối của tác nhân, phương pháp sử dụng, chế độ sử dụng, và các nhân tố khác đã biết đối với bác sỹ điều trị. Liều điều trị hữu hiệu của chất đối kháng cần sử dụng sẽ bị ảnh hưởng bởi các nhân tố cần xem xét này.

Như là một sự gợi ý chung, lượng điều trị hữu hiệu của kháng thể được sử dụng ngoài đường tiêu hoá trên mỗi liều sẽ nằm trong khoảng từ 0,1 đến 20mg/kg trọng lượng cơ thể mỗi ngày, với lượng chất đối kháng ban đầu thường sử dụng nằm trong khoảng từ 2 đến 10mg/kg.

Theo một phương án được ưu tiên, ABM là kháng thể, tốt hơn nếu là kháng thể được nhân tính hoá. Các liều thích hợp của kháng thể không kết hợp chẳng hạn là, nằm trong khoảng từ 20mg/m² đến khoảng 1000mg/m². Theo một phương án, liều kháng thể khác với liều đang được chỉ định đối với RITUXANO®. Ví dụ, có thể cung cấp cho bệnh nhân một hoặc nhiều liều về cơ bản ít hơn 375mg/m² kháng thể,

ví dụ, trong đó liều này nằm trong khoảng từ 20mg/m^2 đến 250mg/m^2 , chẳng hạn khoảng từ 50mg/m^2 đến 200mg/m^2 .

Ngoài ra, có thể cung cấp một hoặc nhiều liều kháng thể ban đầu tiếp theo là một hoặc nhiều liều tiếp theo, trong đó mg/m^2 liều kháng thể ở (các) liều tiếp theo vượt quá mg/m^2 liều kháng thể trong (các) liều ban đầu. Ví dụ, liều ban đầu có thể nằm trong khoảng từ 20mg/m^2 đến 250mg/m^2 (chẳng hạn khoảng từ 50mg/m^2 đến 200mg/m^2) và liều tiếp theo có thể nằm trong khoảng từ 250mg/m^2 đến 1000mg/m^2 .

Như đã nêu trên, tuy nhiên, các lượng ABM đề xuất là vấn đề gây ra nhiều sự xem xét trong điều trị. Nhân tố chính để lựa chọn liều và chế độ thích hợp là kết quả thu được, như chỉ dẫn ở trên. Ví dụ, các liều tương đối cao hơn có thể được cân vào ban đầu để điều trị các bệnh đang phát triển và cấp tính. Để thu được các kết quả hiệu nghiệm nhất, tùy thuộc vào bệnh hoặc rối loạn, chất đối kháng được sử dụng cũng gần tới mức có thể với triệu chứng, chẩn đoán, biểu hiện bên ngoài ban đầu, hoặc sự xuất hiện của bệnh hoặc rối loạn hoặc trong thời gian thuyên giảm của bệnh hoặc rối loạn.

ABM theo sáng chế được cung cấp theo bất kỳ phương pháp thích hợp nào, bao gồm ngoài đường tiêu hoá, dưới da, trong màng bụng, trong phổi, và trong mũi, và, nếu muốn điều trị ức chế miễn dịch cục bộ, trong thương tổn. Tiêm truyền ngoài đường tiêu hoá bao gồm sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong tĩnh mạch, trong màng bụng, hoặc dưới da. Ngoài ra, chất đối kháng có thể được sử dụng một cách thích hợp theo cách tiêm truyền trong mạch, ví dụ, với các liều chất đối kháng giảm. Tốt hơn nếu liều được cung cấp bằng cách tiêm truyền, tốt nhất là tiêm truyền trong tĩnh mạch hoặc dưới da, tùy thuộc vào việc sử dụng ngắn hay thường xuyên.

Có thể sử dụng các hợp chất khác, như các chất gây độc hại tế bào, các tác nhân liệu pháp hoá học, các tác nhân ức chế miễn dịch và/hoặc các cytokin với các chẩn đoán ở đây. Cách sử dụng kết hợp bao gồm cùng sử dụng, nhờ sử dụng các chế phẩm riêng rẽ hoặc được phẩm đơn, và sử dụng liên tiếp theo kiểu này hoặc kiểu kia,

trong đó tốt hơn là có khoảng thời gian khi cả hai (hoặc tất cả) các hoạt chất đồng thời sử dụng các hoạt tính sinh học của chúng.

Sẽ dễ hiểu là liệu được phẩm theo sáng chế cần để đạt được hiệu quả chữa bệnh có thể còn được giảm bằng sự tối ưu hoá chế độ sử dụng.

Theo thực tế của sáng chế, chất mang được có thể là chất mang dạng lỏng. Chất mang lỏng có thể là phospholipit. Ngoài ra, chất mang lipit có thể là axit béo. Hơn nữa, chất mang lipit có thể là chất tẩy rửa. Như được sử dụng ở đây, chất tẩy rửa là bất kỳ chất nào có thể làm thay đổi sức căng bề mặt của chất lỏng, thường làm yếu đi.

Theo một ví dụ của sáng chế, chất tẩy rửa có thể là chất tẩy rửa không ion. Các ví dụ về các chất tẩy rửa không ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polysorbate 80 (cũng được biết là Tween 80 hoặc (polyoxyetylenesorbitan monooleat), Brij, và Triton (ví dụ Triton WR-1339 và Triton A-20).

Theo cách khác, chất tẩy rửa có thể là chất tẩy rửa ion. Ví dụ về chất tẩy rửa ion bao gồm, nhưng không giới hạn ở, alkyltrimethylamoni bromua.

Ngoài ra, theo sáng chế, chất mang lipit có thể là liposom. Như sử dụng trong sáng chế này, thuật ngữ "liposom" là bất kỳ nang nào được bao màng chứa các phân tử bất kỳ theo sáng chế hoặc hỗn hợp của chúng.

Các ví dụ dưới đây giải thích sáng chế chi tiết hơn. Các chế phẩm dưới đây và các ví dụ được đưa ra làm cho người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật có thể hiểu rõ hơn và thực hành được sáng chế. Tuy nhiên, sáng chế không giới hạn trong phạm vi của các phương án minh họa, nó chỉ để minh họa các khía cạnh riêng của sáng chế, và các phương pháp tương đương về mặt chức năng cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Thực vậy, các cải biến khác nhau của sáng chế ngoài các cải biến được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong

lĩnh vực kỹ thuật từ sự mô tả đề cập ở trên và các hình vẽ đi kèm. Các cải biến này cũng nằm trong phạm vi của yêu cầu bảo hộ kèm theo.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Chú ý: Trừ phi có quy định khác, các viện dẫn đến cách đánh số các vị trí gốc axit amin trong các ví dụ dưới đây là theo hệ đánh số Kabat.

Ví dụ 1

Các chất và phương pháp

Tách dòng và biểu hiện B-Lyl kháng thể tái tổ hợp

B-Lyl biểu hiện các tế bào lai hoá được nuôi cấy trong RPMI chứa 10% FBS và 4mM L-glutamin. 6×10^6 tế bào có khả năng sống >90% được thu gom và ARN tổng được phân lập nhờ sử dụng kit Qiagen RNAeasy midi. Các ADN bổ trợ mã hoá các chuỗi nặng và nhẹ có thể biến đổi của B-Lyl được khuếch đại bằng RT-PCR. Phản ứng RT-PCR được tiến hành bằng cách sử dụng các điều kiện dưới đây: 30 phút 50°C cho quá trình tổng hợp ADN bổ trợ thanh nhiễm sắc thứ nhất; 15 phút 95°C quá trình biến tính ban đầu; 30 vòng trong 1 phút 94°C, 1 phút 45°C, 1,5 phút 72°C; và bước kéo dài trong 10 phút ở 72°C. Kích cỡ mong đợi của các sản phẩm PCR được khẳng định bằng phép điện di gel. Các sản phẩm PCR được tách dòng vào các vật truyền E. coli thích hợp và xác định trình tự ADN khẳng định rằng các gen mã hoá chuỗi nặng và nhẹ có thể biến đổi được phân lập.

Đối với cấu trúc của vật truyền biểu hiện B-Lyl dạng khảm, các trình tự tín hiệu tổng hợp và các điểm giới hạn thích hợp được hoà lẫn với các chuỗi có thể biến đổi bằng các phản ứng bổ sung PCR. Sau lần xác nhận cuối cùng trình tự ADN chuẩn của các chuỗi có thể biến đổi, chúng được kết hợp với các vùng không đổi IgG1 ở người. Khi các gen được cấu trúc, chúng được tách dòng dưới sự kiểm soát của các gen khởi đầu MPSV và nằm trước điểm polyA tổng hợp, nhờ sử dụng hai vật

truyền riêng biệt, một vật truyền cho mỗi chuỗi, tạo ra các plasmit pETR1 808 (vật truyền biểu hiện chuỗi nặng) và pETR1813 (vật truyền biểu hiện chuỗi nhẹ). Mỗi vật truyền mang một trình tự EBV OriP.

B-Lyl dạng khảm được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm các tế bào HEK293-EBNA với vật truyền pETR1808 và pETR1813 nhờ sử dụng phương pháp chuyển nhiễm bằng canxi phosphat. Các tế bào HEK293-EBNA lũy thừa sinh trưởng được chuyển nhiễm phương pháp canxi phosphat. Các tế bào phát triển như đơn lớp dính bám được nuôi cấy trong bình T nhờ sử dụng môi trường nuôi cấy DMEM có bổ sung 10% FCS, và được chuyển nhiễm khi chúng nhập dòng khoảng 50 và 80%. Đối với quá trình chuyển nhiễm trong bình T75, 8 triệu tế bào được cấy 24 giờ trước khi chuyển nhiễm trong môi trường nuôi cấy 14ml DMEM có bổ sung FCS (ở thể tích cuối cùng 10% V/V), 250µg/ml neomycin, và các tế bào được đặt ở 37°C trong lồng ấp với 5% khí CO₂ qua đêm. Đối với mỗi bình T75 cần chuyển nhiễm, dung dịch chứa ADN, CaCl₂ và nước được chuẩn bị 47µg ADN vật truyền plasmit tổng được chia ra đều nhau giữa các vật truyền biểu hiện chuỗi nặng và nhẹ, 235µl dung dịch 1M CaCl₂, và bổ sung nước đến thể tích cuối cùng là 469µl. Thêm vào dung dịch này, 469µl 50mM HEPES, 280mM NaCl, 1,5mM dung dịch Na₂HPO₄ ở độ pH=7,05, trộn ngay trong 10 giây và để lắng ở nhiệt độ phòng trong 20 giây. Huyền phù được pha loãng bằng 12ml DMEM có bổ sung 2% FCS, và thêm vào T75 thay cho môi trường đang tồn tại. Các tế bào được ủ ở 37°C, 5% CO₂ trong khoảng 17 đến 20 giờ, sau đó môi trường được thay thế bằng 12ml DMEM, 10% FCS. Đối với quá trình tạo ra kháng thể không cải biến "chB-Lyl", các tế bào được chuyển nhiễm chỉ bằng các vật truyền biểu hiện kháng thể pETR1808 và pETR1813 ở tỷ lệ 1:1. Đối với quá trình tạo ra kháng thể xử lý glyco "chB-Lyl-ge", các tế bào được đồng chuyển nhiễm bằng bốn plasmit, hai cho quá trình biểu hiện kháng thể (pETR1808 và pETR1813), một cho quá trình biểu hiện polypeptit GnTIII thể dung hợp (pETR1519), và một cho quá trình biểu hiện manosidaza II (pCLF9) ở tỷ lệ tương ứng 4:4:1:1. Vào ngày thứ 5 sau khi chuyển nhiễm, phân dịch nổi được thu gom, ly

tâm trong 5 phút với vận tốc 1200 vòng/phút tiếp theo là quá trình ly tâm thứ hai trong 10 phút với vận tốc 4000 vòng phút và ở ở 4°C.

ChB-Lyl và chB-Lyl-ge được làm sạch từ phần dịch nuôi cấy nhờ sử dụng ba bước sắc ký liên tiếp, phép sắc ký Protein A, phép sắc ký trao đổi cation, và bước sắc ký loại trừ kích cỡ trên cột Superdex 200 (Amersham Pharmacia) trao đổi dung dịch đệm thành nước muối chứa chất đệm phosphat và thu gom đỉnh kháng thể nguyên từ bước cuối này. Nồng độ kháng thể được dự đoán nhờ sử dụng phổ quang kế từ hệ số hấp thụ 280nm.

Phân tích Oligosacarit

Các oligosacarit được giải phóng do enzym từ các kháng thể nhờ cắt bằng PNGaseF, với các kháng thể hoặc được làm bất hoạt trên màng PVDF hoặc trong dung dịch.

Dung dịch cắt thu được chứa các oligosacarit giải phóng hoặc được chuẩn bị trực tiếp cho phân tích MALDI/TOF-MS hoặc còn được cắt bằng EndoH glycosidaza trước khi chuẩn bị mẫu cho phân tích MALDI/TOF-MS.

Phương pháp giải phóng oligosacarit cho các kháng thể được làm bất hoạt bằng màng PVDF

Các giếng của đĩa 96 giếng được tạo ra bằng màng PVDF (Immobilon P, Millipore, Bedford, Massachusetts) được làm ướt bằng 100µl metanol và dung dịch này được rút ra qua màng PVDF nhờ chân không áp dụng với ống góp chân không Multiscreen (Millipore, Bedford, Massachusetts). Các màng PVDF được rửa ba lần bằng 300µl nước. Sau đó các giếng được rửa bằng 50µl dung dịch đệm RCM (8M Urea, 360mM Tris, 3,2mM EDTA, pH 8,6). Khoảng 30-40µg kháng thể được đưa vào trong giếng chứa 10µl dung dịch đệm RCM. Dung dịch trong giếng được rút ra qua màng bằng cách sử dụng chân không, và màng này được rửa liên tiếp hai lần

bằng 50µl dung dịch đệm RCM. Quá trình khử các cầu disulfua được tiến hành bằng cách bổ sung 50µl 0,1M dithiotreitol trong RCM và ủ ở 37°C trong 1 giờ.

Tiếp theo quá trình khử, chân không được sử dụng để loại bỏ dung dịch dithiotreitol khỏi giếng. Các giếng được rửa ba lần bằng 300µl nước trước khi tiến hành quá trình carboxymetyl hoá các gốc cystein bằng cách bổ sung 50µl axit iodoacetic 0,1M trong dung dịch RCM và ủ ở nhiệt độ phòng trong bóng tối trong 30 phút.

Sau khi carboxymetyl hoá, các giếng được loại bỏ bằng chân không và sau đó rửa ba lần bằng 300µl nước. Màng PVDF sau đó được phong bế để ức chế quá trình hấp phụ endoglycosidaza, bằng cách ủ 100µl dung dịch nước polyvinylpyrrolidon 360 1% ở nhiệt độ phòng trong 1 giờ. Chất phản ứng phong bế sau đó được loại bỏ từ từ bằng chân không và tiếp theo rửa ba lần bằng 300µl nước.

Các oligosacarit liên kết N được giải phóng bằng cách bổ sung 2,5mU peptid-N-glycosydaza F (N-Glycanaza tái tổ hợp, GLYKO, Novato, CA) và 0,1mU Sialidaza (GLYKO, Novato, CA), để loại bỏ bất kỳ gốc monosacarit đích điện nào, ở thể tích cuối cùng là 25µl trong 20mM NaHCO₃, pH= 7,0). Quá trình cắt được tiến hành trong 3 giờ ở 37°C.

Phương pháp giải phóng oligosacarit đối với các kháng thể trong dung dịch

Khoảng 40 và 50µg kháng thể được trộn với 2,5mU PNGaseF (Glyko, U. S. A.) trong 2mM Tris, pH=7,0 ở thể tích cuối cùng là 25 microlit, và hỗn hợp được ủ trong 3 giờ ở 37°C.

Sử dụng quá trình cắt Endoglycosidaza H của các oligosacarit giải phóng bằng PNGaseF để định các cấu trúc oligosacarit cắt đôi lại hoá tới các đỉnh oligosacarit MALDI/TOF-MS trung hoà

Oligosacarit giải phóng bằng PNGaseF sau đó được cắt bằng Endoglycosidaza H (EC 3.2.1.96). Đối với quá trình cắt EndoH, 15mU EndoH (Roche, Switzerland) được thêm vào PNGaseF digest (kháng thể trong phương pháp dung dịch nêu trên) để tạo ra thể tích cuối cùng là 30 microlit, và hỗn hợp được ủ trong 3 giờ ở 37°C. EndoH phân cắt giữa các gốc N-acetylglucosamin của nhân chitobioza của các oligosacarit liên kết N. Enzym chỉ có thể cắt oligomanoza và nhất là các loại polysacarit loại lai hoá, trong khi các oligosacarit loại phức hợp không được thuỷ phân.

Chuẩn bị mẫu cho MALDI/TOF-MS

Các cắt (digest) enzym chứa các oligosacarit giải phóng được ủ thêm 3 giờ ở nhiệt độ phòng sau khi bổ sung axit axetic tới nồng độ cuối cùng là 150mM, và sau đó được cho qua 0,6ml nhựa trao đổi cation (nhựa AG50W-X8, dạng hydro, cỡ sàng 100-200, BioRad, Switzerland) tập hợp trong cột sắc ký micro-bio-spin (BioRad, Switzerland) để loại bỏ các cation và protein. Một microlit mẫu thu được được đặt vào một đĩa đích bằng thép không gỉ, và trộn trên đĩa với 1µl chất sDHB. Chất sDHB được chuẩn bị bằng cách hoà tan 2mg axit 2,5-dihydroxybenzoic cùng với 0,1mg axit 5-metoxysalixylic trong 1ml etanol/10mM dung dịch nước natri clorua với tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích). Các mẫu được làm khô bằng không khí, 0,2µl etanol được đưa vào, và cuối cùng các mẫu được tái kết tinh trong không khí.

MALDI/TOF-MS

Máy phân tích khối phổ MALDI-TOF đã sử dụng thu được phổ khối là Voyager Elite (Perspective Biosystems). Thiết bị này được điều khiển trong cấu hình tuyến tính, với sự tăng tốc là 20kV và cản trở 80ns. Quá trình hiệu chuẩn bên ngoài nhờ sử dụng các tiêu chuẩn oligosacarit được sử dụng để định khối của các ion. Phổ từ 200 lần bắn tia laze được cộng lại để thu được phổ cuối cùng.

Quá trình làm suy kiệt hoàn toàn tế bào máu B

495µl máu heparin hoá từ người cho khoẻ mạnh được chia vào các ống polystyren 5ml, 5µl các mẫu kháng thể nồng độ gấp 100 lần (nồng độ cuối cùng 1-1000ng/ml) hoặc chỉ PBS được thêm vào và các ống được ủ ở 37°. Sau 24 giờ, 50µl máu được chuyển vào các ống sạch và nhuộm bằng kháng-CD3-FITC, kháng-CD19-PE và kháng-CD45-CyChrome (Becton-Dickinson) trong 15 phút ở nhiệt độ phòng trong bóng tối. Trước khi phân tích, 500µl dung dịch đệm FACS (PBS chứa FCS 2% và 5mM EDTA) được thêm vào các ống. Sự phát huỳnh quang CD3-FITC và CD19-PE của các mẫu máu được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng bằng cách đặt ngưỡng trên CD45-CyChrome. Quá trình làm suy kiệt tế bào B được xác định bằng cách vẽ biểu đồ tỷ lệ các tế bào CD19⁺ B đến các tế bào CD3⁺ T.

Gắn kết các kháng thể kháng CD20 với các tế bào Raji

500.000 trong 180µl dung dịch đệm FACS (PBS chứa FCS 2% và 5mM EDTA) được chuyển vào các ống polystyren 5ml và 20µl các mẫu kháng thể kháng CD20 nồng độ gấp 20 lần (nồng độ cuối cùng 1-5000ng/ml) hoặc chỉ PBS được thêm vào và các ống được ủ ở 4°C trong 30 phút. Sau đó, các mẫu được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và tạo hạt ở 300xg trong 3 phút. Phần dịch nổi được hút ra và các tế bào được hấp thụ trong 100Φl dung dịch đệm FACS 1µl các phân kháng Fc-đặc hiệu F(ab')₂-FITC (Jackson Immune Research Laboratories, USA) được thêm vào và các ống được ủ ở 4°C trong 30 phút. Các mẫu được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và hấp thụ trong 500µl dung dịch đệm FACS chứa 0,5µg/ml PI để phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng. Mức gắn kết được xác định bằng cách vẽ biểu đồ sự phát huỳnh quang trung bình hình học so với các nồng độ kháng thể.

Ví dụ 2

Phương pháp thụ thể có độ tương đồng cao

Nghiên cứu về khung thụ thể kháng thể có độ tương đồng cao được tiến hành bằng cách xếp thẳng hàng trình tự protein chuột B-lyl để thu gom các trình tự dòng

phôi người và chỉ ra rằng trình tự ở người có tính đồng nhất trình tự cao nhất. Ở đây, trình tự VH110 từ cơ sở dữ liệu VBase được chọn làm trình tự thụ thể khung chuỗi nặng, và trình tự VK_2_40 được chọn là thụ thể khung cho chuỗi nhẹ. Trên hai khung thụ thể này, có ba vùng xác định hỗ trợ (CDR) của các vùng có thể biến đổi nặng và nhẹ ở chuột được cấy ghép. Vì vùng khung 4 không phải là một phần của vùng có thể biến đổi của gen dòng phôi V, việc xếp thẳng hàng đối với vị trí đó được thực hiện riêng rẽ. Vùng JH4 được chọn cho chuỗi nặng và vùng JK4 được chọn cho chuỗi nhẹ. Mô hình phân tử của vùng globulin miễn dịch được đưa vào bộc lộ một điểm có thể cần đến các gốc axit amin ở chuột thay cho các gốc ở người ngoài CDR. Các gốc axit amin ở chuột được đưa lại vào khung xương người sẽ tạo ra cái gọi là các quá trình đột biến. Ví dụ, gốc axit amin thụ thể người ở vị trí Kabat 27 được đột biến ngược thành gốc tyrosin. Các thể biến dị kháng thể được nhân tính hoá được đưa vào hoặc bao gồm hoặc bỏ qua các quá trình đột biến ngược. Sau khi đưa vào các trình tự protein, các trình tự ADN mã hoá các protein được tổng hợp như mô tả chi tiết dưới đây.

Phương pháp khung kết hợp

Để tránh đưa vào các quá trình đột biến ngược ở các vị trí gốc axit amin (giới hạn để giữ ái lực gắn kết kháng nguyên hoặc các chức năng kháng thể) của khung thụ thể ở người, đã nghiên cứu xem rằng liệu hoặc toàn bộ vùng khung 1 (FR1), hoặc các vùng khung 1 (FR1) và 2 (FR2) cùng nhau, có thể được thay thế bằng các trình tự kháng thể người đã có các gốc thể cho hay không, hoặc các loại chức năng tương đương, ở các vị trí quan trọng trong trình tự dòng phôi người tự nhiên. Đối với mục đích này, các khung VH 1 và 2 của trình tự ở chuột Byl được xếp thẳng hàng riêng rẽ với các trình tự dòng phôi ở người. Ở đây, tính đồng nhất trình tự cao nhất không quan trọng, và không được sử dụng, để chọn các khung thụ thể, nhưng thay thế thích hợp cho các một vài gốc tới hạn được cho là quan trọng hơn. Các gốc quan trọng này bao gồm các gốc 24, 71, và 94 (cách đánh số Kabat), và cả các gốc ở vị trí 27, 28, và 30 (cách đánh số Kabat), nó nằm ngoài sự xác định CDR1 của Kabat, nhưng thường

liên quan đến sự gắn kết kháng nguyên. Trình tự IMGT VH_3_15 được chọn làm trình tự thích hợp. Sau khi đưa vào các trình tự protein, các trình tự ADN mã hoá các protein được tổng hợp như được mô tả chi tiết dưới đây. Nhờ sử dụng phương pháp này không cần đến các quá trình đột biến ngược hoặc cho chuỗi nặng hoặc nhẹ, để giữ được các mức gắn kết kháng nguyên tốt.

Tổng hợp các gen kháng thể

Sau khi đưa vào các trình tự axit amin của vùng kháng thể được nhân tính hoá V, trình tự ADN phải được tạo ra. Thông số về trình tự ADN của các vùng khung riêng rẽ được thấy trong cơ sở dữ liệu cho các trình tự dòng phôi người. Trình tự ADN của các vùng CDR được lấy từ thông số ADN hỗ trợ tương ứng của chuột. Với các trình tự này, toàn bộ trình tự ADN gần như được thu gom. Có thông số trình tự ADN này, các điểm giới hạn chẩn đoán được đưa vào trong trình tự ảo, bằng cách đưa vào các đột biến câm, tạo ra điểm nhận biết đối với các endonucleaza giới hạn. Để thu được chuỗi ADN tự nhiên, quá trình tổng hợp gen được tiến hành (ví dụ, Wheeler et al. 1995). Trong phương pháp này, các oligonucleotit được đưa vào từ các gen quan tâm, như hàng loạt các oligonucleotit thu được từ dải mã hoá, và một loạt khác là từ dải không mã hoá. Các đầu tận cùng 3' và 5' của mỗi oligonucleotit (ngoại trừ ở chính vị trí đầu tiên và cuối cùng trong hàng) luôn có các trình tự hỗ trợ cho hai đoạn môi thu được từ dải đối diện. Khi đặt các oligonucleotit vào dung dịch đệm phản ứng thích hợp đối với bất kỳ polymeraza ổn định nhiệt nào, và thêm Mg^{2+} , dNTPs và polymeraza ADN, mỗi oligonucleotit được kéo dài từ đầu 3' của nó. Đầu 3' mới được tạo thành của một đoạn môi sau đó ủ với đoạn môi tiếp theo của dải đối diện, và kéo dài trình tự của nó hơn nữa trong các điều kiện thích hợp cho sự kéo dài chuỗi ADN mẫu phụ thuộc. Sản phẩm mẫu cuối cùng được tách dòng vào vật truyền thông thường để nhân lên trong E. coli.

Quá trình tạo ra kháng thể

Các trình tự dẫn đầu chuỗi nặng và nhẹ ở người (để xuất tiết) được thêm vào nằm trước của các trình tự vùng có thể biến đổi nêu trên và sau đó được nối nằm trước của các trình tự chuỗi nhẹ và nặng IgG1 kappa không đổi ở người tương ứng, nhờ các phương pháp kỹ thuật phân tử sinh học chuẩn. Các trình tự ADN chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể đầy đủ thu được tách dòng phụ vào các vật truyền biểu hiện ở động vật có vú (một cho chuỗi nhẹ và một cho chuỗi nặng) dưới sự kiểm soát của gen khởi đầu MPSV và nằm trước điểm tổng hợp polyA, mỗi vật truyền mang một trình tự EBV OriP, như được mô tả trong Ví dụ 1 nêu trên. Các kháng thể được tạo ra như được mô tả trong Ví dụ 1 nêu trên, cụ thể là bằng cách đồng chuyển nhiễm HEK293-EBNA với các vật truyền biểu hiện chuỗi nặng và nhẹ của kháng thể ở động vật có vú, thu gom môi trường nuôi cấy có điều kiện từ 5 đến 7 ngày sau khi chuyển nhiễm, và làm sạch các kháng thể tiết xuất bằng sắc ký ái lực protein A, tiếp theo là bằng sắc ký trao đổi cation và kích cỡ cuối cùng loại trừ bước sắc ký để phân lập các kháng thể IgG1 đơn tinh khiết. Các kháng thể được tạo ra trong 25mM kali phosphat, 125mM natri clorua, 100mM dung dịch glyxin có độ pH=6,7. Các thể biến dị được xử lý glyco của các thể biến dị kháng thể được nhân tính hoá được tạo ra bằng cách đồng chuyển nhiễm các vật truyền biểu hiện kháng thể cùng với các vật truyền biểu hiện GnT-III glycosyltransferaza, hoặc cùng với vật truyền biểu hiện GnT-III cộng với vật truyền biểu hiện Golgi manosidaza II, như được mô tả đối với các kháng thể dạng khảm trong Ví dụ 1 nêu trên. Các kháng thể được xử lý Glyco được làm sạch và bào chế như mô tả ở trên đối với các kháng thể không xử lý glyco. Các oligosacarit gắn với vùng Fc của các kháng thể được phân tích bằng MALDI/TOF-MS như được mô tả ở trên.

Phân tích oligosacarit

Phương pháp giải phóng oligosacarit đối với các kháng thể trong dung dịch.

Khoảng 40 và 50µl kháng thể được trộn với 2,5mU PNGaseF (Glyko, U.S.A.) trong 2mM Tris, độ pH=7,0 ở thể tích cuối cùng là 25 microlit, và hỗn hợp được ủ trong 3 giờ ở 37°C.

Chuẩn bị mẫu cho MALDI/TOF-MS

Cắt enzyme chứa các oligosacarit giải phóng được ủ thêm 3 giờ ở nhiệt độ phòng sau khi bổ sung axit axetic đến nồng độ cuối cùng là 150mM, và tiếp theo cho qua 0,6ml nhựa trao đổi cation (nhựa AG50W-X8, dạng hydro, cỡ sàng 100-200, BioRad, Switzerland) tập hợp trên cột sắc ký micro-bio-spin (BioRad, Switzerland) để loại bỏ các cation và protein. Một microlit mẫu thu được được đặt vào trong đĩa đích bằng thép không gỉ, và trộn trên đĩa với 1µl chất nền SDHB. Chất nền SDHB được tạo ra bằng cách hoà tan 2mg axit 2,5-dihydroxybenzoic cùng với 0,1mg axit 5-metoxysalicylic trong 1ml etanol/10mM dung dịch nước natri clorua với tỷ lệ 1:1 (thể tích/thể tích). Các mẫu được làm khô bằng không khí, 0,2µl etanol được đưa vào, và cuối cùng các mẫu được tái kết tinh trong không khí.

MALDI/TOF-MS

Máy đo phổ khối MALDI-TOF đã sử dụng thu được phổ khối là Voyager Elite (Perspective Biosystems). Thiết bị này được điều khiển trong cấu hình tuyến tính, với sự tăng tốc là 20kV và cản trở 80ns. Quá trình hiệu chuẩn bên ngoài nhờ sử dụng các tiêu chuẩn oligosacarit được sử dụng để định khối của các ion. Phổ từ 200 lần bắn laze được cộng lại để thu được phổ cuối cùng.

Thử nghiệm gắn kết kháng nguyên

Các biến thể kháng thể đơn được nhân tính hoá, tinh khiết được thử nghiệm về sự gắn kết với CD20 của người trên các tế bào đích u lympho tế bào Raji B- nhờ sử dụng thử nghiệm dựa vào phương pháp đếm tế bào theo dòng, như được mô tả đối với kháng thể dạng khảm B-lyl trong Ví dụ 1 nêu trên.

Gắn kết các biến thể glyco IgG1 với các tế bào NK và dòng tế bào CHO biểu hiện FC γ RIIIA.

Các tế bào NK người được phân lập từ các tế bào máu ngoại vi đơn nhân mới phân lập (PBMC) tạo ra quá trình chọn lọc âm tính làm giàu cho các tế bào dương tính CD 16- và CD56- (MACS system, Miltenyi Biotec GmbH, BergischGladbach/Germany). Độ tinh khiết được xác định bằng sự biểu hiện CD56 nằm trong khoảng 88-95%. Các tế bào mới phân lập NK được ủ trong PBS không có các ion canxi và magie (3×10^5 tế bào/ml) trong 20 phút ở 37°C để loại bỏ IgG liên quan đến tế bào NK. Các tế bào được ủ với 10^6 tế bào/ml ở các nồng độ kháng thể kháng CD20 khác nhau (0, 0,1, 0,3, 1, 3, 10 μ g/ml) trong PBS, 0,1% BSA. Sau vài lần rửa gắn kết kháng thể được dò bằng cách ủ với 1:200 F(ab')₂ dê kháng người liên kết FITC, IgG đặc hiệu F(ab')₂ (Jackson Immuno Research, West Grove, PA/USA) và CD56-PE kháng người (BD Biosciences, Allschwil/Switzerland). Các phần kháng Fc γ RIIIA 3G8 F(ab')₂ (Ancell, Bayport, MN/USA) được thêm vào ở nồng độ 10 μ g/ml để cạnh tranh gắn kết các kháng thể glyco (3 μ g/ml). Cường độ huỳnh quang liên quan đến các thể biến dị kháng thể gắn kết được xác định đối với các tế bào dương tính CD56 trên FACSCalibur (BD Biosciences, Allschwil/Switzerland). Các tế bào CHO được chuyển nhiễm bằng phương pháp điện di (280V, 950 μ F, 0,4cm) với vật truyền biểu hiện mã hoá chuỗi α Fc γ RIIIA-Vall58 và chuỗi γ . Các thể chuyển nhiễm được chọn lọc bằng cách bổ sung 6 μ g/ml puromyxin và các dòng vô tính ổn định được phân tích bằng FACS nhờ sử dụng 10 μ l kháng thể đơn dòng FITC-gắn kết- kháng-Fc γ RIII 3G8 (BD Biosciences, Allschwil/Switzerland) cho 10^6 tế bào. Gắn kết IgG1 với các tế bào CHO biểu hiện Fc γ RIIIA-Vall58 được thực hiện tương tự với quá trình gắn kết tế bào NK được mô tả ở trên.

Thử nghiệm ADCC

Các tế bào máu ngoại vi đơn nhân ở người (PBMC) được sử dụng làm các tế bào tác động và được chuẩn bị nhờ sử dụng Histopaque-1077 (Sigma Diagnostics Inc., St. Louis, MO 63178 USA) và về cơ bản theo các chỉ dẫn của nhà sản xuất. Tóm lại, máu trong tĩnh mạch được lấy bằng các bơm tiêm có heparin từ những người tình nguyện. Máu được pha loãng với tỷ lệ 1:0,75-1,3 bằng PBS (không chứa Ca^{++} hoặc Mg^{++}) và đặt từng lớp trên Histopaque-1077. Gradient được ly tâm ở 400xg trong 30 phút ở nhiệt độ phòng (RT) không ngắt quãng. Vùng liên pha chứa PBMC được thu gom và rửa bằng PBS (50ml trên các tế bào từ hai gradient) và thu gom bằng cách làm ly tâm ở 300xg trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau khi tái tạo huyền phù hạt bằng PBS, PBMC được đếm và rửa lần thứ hai bằng cách làm ly tâm ở 200xg trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Các tế bào sau đó được tái tạo huyền phù trong môi trường thích hợp cho các quy trình tiếp theo.

Chất tác động so với tỷ lệ đích được sử dụng cho các thử nghiệm ADCC là 25:1 và 10:1 tương ứng đối với PBMC và các tế bào NK. Các tế bào tác động được chuẩn bị trong môi trường AIM-V ở nồng độ thích hợp để thêm vào 50 μ l trên mỗi giếng của đĩa đáy tròn 96 giếng. Các tế bào đích là các tế bào u lympho B ở người (ví dụ, các tế bào Raji) được nuôi cấy trong DMEM chứa FCS 10%. Các tế bào đích được rửa trong PBS, đếm và tái tạo huyền phù trong AIM-V với 0,3 triệu trên ml để thêm vào 30'000 tế bào trong 100 μ l trên mỗi vi giếng. Các kháng thể được pha loãng trong AIM-V, thêm trong 50 μ l vào các tế bào đích đã được bọc trước và cho phép gắn kết với các đích trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các tế bào tác động được thêm vào và đĩa được ủ trong 4 giờ ở 37°C trong không khí ẩm chứa 5% CO_2 . Mức tử vong của các tế bào đích được đánh giá bằng cách xác định bằng lactat dehydrogenaza (LDH) giải phóng từ các tế bào bị phá huỷ nhờ sử dụng kit Cytotoxicity Detection (Roche Diagnostics, Rotkreuz, Switzerland). Sau 4 giờ ủ, các đĩa được ly tâm ở 800xg. 100 μ l phần dịch nổi từ mỗi giếng được chuyển tới đĩa đáy bằng trong suốt mới 96 giếng. 100 μ l chất đệm màu từ kit được thêm vào mỗi giếng. Các giá trị V_{max} của phản ứng màu được xác định trong đầu đọc ELISA ở 490nm trong ít

nhất 10 phút nhờ sử dụng phần mềm SOFTmax PRO (Molecular Devices, Sunnyvale, CA94089, USA). LDH tự phát giải phóng được xác định từ các giếng chỉ chứa các tế bào đích đích và tác động nhưng không chứa kháng thể. Mức giải phóng tối đa được xác định từ các giếng chỉ chứa các tế bào đích và 1% Triton X-100. Tỷ lệ phần trăm tử vong do kháng thể đặc hiệu được tính toán như sau: $((x-SR)/(MR-SR))*100$, trong đó x là giá trị trung bình của Vmax ở nồng độ kháng thể đặc hiệu, SR là giá trị trung bình của Vmax ở mức giải phóng tự phát và MR là giá trị trung bình của Vmax ở mức giải phóng tối đa.

Thử nghiệm tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ trợ

Các tế bào đích được đếm, rửa bằng PBS, tái tạo huyền phù trong AIM-V (Invitrogen) với 1 triệu tế bào mỗi ml. 50 μ l tế bào được đặt vào mỗi giếng trong đĩa đáy bằng 96 giếng. Các dung dịch kháng thể pha loãng được chuẩn bị trong AIM-V và thêm 50 μ l vào các giếng. Kháng thể được gắn kết với các tế bào trong 10 phút ở nhiệt độ phòng. Tế bào khuyết huyết thanh người (Quidel) mới được làm tan, pha loãng ba lần bằng AIM-V và thêm 50 μ l vào các giếng. Tế bào khuyết thỏ (Cedarlane Laboratories) được chuẩn bị như được mô tả bởi nhà sản xuất, được pha loãng ba lần bằng AIM-V và thêm 50 μ l vào các giếng. Để làm đối chứng, các nguồn tế bào khuyết được gia nhiệt trong 30 phút ở 56°C trước khi thêm vào thử nghiệm.

Các đĩa thử nghiệm được ủ trong 2 giờ ở 37°C. Tỷ lệ tử vong của các tế bào được xác định bằng cách xác định mức độ giải phóng. Tóm lại, các đĩa được ly tâm ở 300xg trong 3 phút. 50 μ l dịch nổi được chuyển vào đĩa 96 giếng mới và 50 μ l chất phản ứng thử nghiệm từ Cytotoxicity Kit (Roche) được thêm vào. Phép đo động bằng đầu đọc ELISA xác định Vmax tương ứng với nồng độ LDH trong dịch nổi. Mức giải phóng tối đa được xác định bằng cách ủ các tế bào với sự có mặt của 1% Triton X-100.

Thử nghiệm làm suy kiệt tế bào B trong toàn bộ máu

Quá trình làm suy kiệt tế bào B trong toàn bộ máu bằng các kháng thể kháng CD20 được tiến hành như được mô tả trong Ví dụ 1 nêu trên.

Thử nghiệm gây chết tế bào

Khả năng gây chết tế bào của các kháng thể được thử nghiệm bằng cách ủ kháng thể ở 10 μ g/ml (các điều kiện bão hoà đối với gắn kết kháng nguyên) với các tế bào đích (ở nồng độ tế bào đích là 5x10⁵ tế bào/ml) qua đêm (16-24 giờ). Các mẫu được nhuộm bằng AnnV-FITC và phân tích bằng FACS. Thử nghiệm được tiến hành ba lần.

Quá trình thăm dò được tiến hành bằng cách phương pháp đếm tế bào theo dòng tiếp theo là bằng sự xuất hiện của các gen đánh dấu gây chết tế bào như annexin V và phosphatidy serin. Đối chứng âm tính (không gây chết tế bào) không chứa bất kỳ kháng thể nào, mà chỉ chứa nước muối đệm phosphat. Đối chứng âm tính (gây chết tế bào) chứa 5 micromol tác nhân gây chết tế bào mạnh Camptothecin (CPT).

Các kết quả và thảo luận

So sánh sự gắn kết với kháng nguyên CD20 của các thể biến dị kháng thể B-HH1, B-HH2, B-HH3, hoặc kết hợp với chuỗi nhẹ dạng khảm B-lyl (mVL, như được mô tả trong Ví dụ 1 nêu trên) với chuỗi nhẹ B-lyl (KV1), và kháng thể gốc, dạng khảm chB-lyl (được mô tả trong Ví dụ 1 nêu trên) chứng tỏ rằng tất cả các kháng thể có giá trị EC₅₀ tương tự, nhưng cấu trúc B-HH1 liên kết với cường độ/hệ số tỷ lệ thấp hơn các thể biến dị B-HH2 và B-HH3 (Fig.11). B-HH1 có thể được phân biệt với B-HH2 và B-HH3 bởi một phần các vùng ở người CDR1 và CDR2 (định nghĩa Kabat), cũng như hiện tượng đa hình Ala/Thr ở vị trí 28 (cách đánh số Kabat). Điều này chứng tỏ rằng hoặc ở vị trí 28, CDR1 hoàn chỉnh, và/hoặc CDR2 hoàn chỉnh là quan trọng đối với sự tương tác kháng thể/kháng nguyên.

So sánh B-HL1, B-HH1, và kháng thể gốc dạng khảm chB-lyl thấy rằng không có bất kỳ hoạt tính gắn kết nào trong cấu trúc B-HL1, và khoảng một nửa cường độ/hệ số tỷ lệ gắn kết của B-HH1 so được B-lyl (Fig.12). Cả B-HL1 cũng như B-HH1 được tạo ra dựa vào các khung thụ thể thu được từ nhóm VH1 người. Trong số các khác biệt khác, vị trí 71 (cách đánh số Kabat; vị trí Kabat 71 tương ứng với vị trí 72 của SEQ ID NO:48) của cấu trúc B-HL1 là khác biệt đáng chú ý, biểu thị tầm quan trọng giả định của nó đối với gắn kết kháng nguyên.

Khi so sánh thông số gắn kết kháng nguyên ở Fig.9 đến Fig.13, các thể biến dị BHH2-KV1, BHL8-KV1, và BHL11-KV1 thể hiện ái lực gắn kết tốt nhất, trong số các thể biến dị kháng thể được nhân tính hoá khác được thử nghiệm, với CD20 ở người trên bề mặt của các tế bào ở người. Các khác biệt giữa B-HH2, nói cách khác, và B-HL8 và B-HL11 nói cách khác được định vị chỉ trong các vùng FR1 và FR2, với cả ba CDR là đồng nhất (ví dụ, so sánh các SEQ ID NO: 32, 56, và 60, không được đánh số theo Kabat, nhưng cách đánh số của Kabat có thể dễ dàng được xác định bởi một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật). B-HL8 và B-HL11 có các trình tự FR1 và FR2 của nó thu được từ nhóm VH3 người, trong khi khung B-HH2 hoàn chỉnh thu được từ VH1 người. B-HL11 là dẫn xuất của B-HL8 có đột biến đơn Glu1 Gln (vị trí 1 là giống với cách đánh số Kabat và hệ đánh số thông thường đã sử dụng trong danh sách trình tự), với Gln là gốc axit amin trong cấu trúc B-HH2. Điều này có nghĩa là sự trao đổi Glu1Gln không làm biến đổi ái lực hoặc cường độ gắn kết. Các khác biệt khác giữa B-HH2 và B-HL8 là 14 gốc khung, trong đó một hoặc nhiều gốc sẽ tác động đến tập tính gắn kết kháng nguyên của kháng thể này.

Cấu trúc B-HL4 thu được từ kháng thể B-HH2 bằng cách thay thế FR1 của B-HH2 bằng của trình tự dòng phôi người VH1_45. Cấu trúc này có khả năng gắn kết kháng nguyên rất giảm, mặc dù có các axit amin khác chỉ ở ba vị trí trong FR1. Các gốc đó được định vị ở các vị trí 2, 14, và 30 (cách đánh số Kabat). Trong các vị trí đó, vị trí 30 có thể là vị trí có ảnh hưởng, vì nó là một phần xác định Chothia của

CDR1. Toàn bộ phân tích về tất cả các đường cong gắn kết từ Fig.9 đến Fig.13 chứng tỏ rằng các gốc chuỗi nặng B-lyl (cách đánh số Kabat) là quan trọng đối với gắn kết CD20: N35 (đầu tận cùng của Kabat CDR1), Kabat CDR1 đầy đủ, Kabat CDR2 đầy đủ và Kabat CDR3 đầy đủ, các gốc A71 và R94 (trong trường hợp này R94 không thể được thay thế bằng threonin) và Y27. A28 và S30 cũng góp phần với mức độ ít hơn. Ngoài ra, Kabat CDR3 và tất cả các gốc chính tắc là quan trọng đối với gắn kết kháng nguyên. Không có các đột biến ngược được đưa vào trong chuỗi nhẹ được nhân tính hoá, nó có Kabat CDR1, CDR2 và CDR3 đầy đủ được cấy ghép. Để gây chết tế bào (các Fig.14, 15 và 21), thể biến dị hiệu nghiệm nhất là thể biến dị BHH2-KV1 của B-lyl được nhân tính hoá (thậm chí hiệu nghiệm hơn chB-lyl gốc và hiệu nghiệm hơn rất nhiều kháng thể có trình tự đồng nhất với rituximab, C2B8). Các thể biến dị được nhân tính hoá khác (các dẫn xuất của BHL8) có thể khôi phục sự gây chết tế bào tăng là: B-HL12 đến B-HL17 (xem Bảng) và BHH8 (các khung hỗn hợp) và BHH9 ("các khung hỗn hợp" có một đột biến ngược, S30T). Các vị trí 9 và 48 (cách đánh số Kabat) có thể tiếp xúc với kháng nguyên. Các thể biến dị BHH4 đến BHH7 là các thể biến dị B-lyl được nhân tính hoá không đưa vào các trình tự bổ sung không phải ở người.

Các tính chất quan trọng của kháng thể được nhân tính hoá B-lyl đó là nó là kháng thể kháng CD20 typ II như được xác định trong Cragg, M. S. and Glennie, M. J., Blood 103 (7): 2738-2743 (April 2004). Vì vậy nó không kích thích, khi liên kết với CD20, bất kỳ tính đề kháng nào quan trọng với quá trình chiết xuất chất tẩy rửa không ion của CD20 khỏi bề mặt của CD20+ các tế bào ở người, nhờ sử dụng thử nghiệm được mô tả cho mục đích này trong Polyak, M. J. and Deans, J. P., Blood 99(9): 3256-3262 (2002). Nó kích thích ít hơn đáng kể một số tính đề kháng quan trọng với quá trình chiết xuất chất tẩy rửa không ion của CD20 so với kháng thể C2B8 (kháng thể kháng CD20 khác có trình tự tương đồng với rituximab, (xem công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003 0003097 của Reff). Như mong đợi đối với loại kháng thể kháng CD20 typ II, B-lyl được nhân tính hoá không có bất kỳ hoạt tính phân giải do nhóm bổ thể tạo ra đáng kể nào và tất nhiên hoạt tính phân giải do

nhóm bổ thể tạo ra nhiều hơn kháng thể kháng CD20 C2B8 (IgG1 dạng khảm có trình tự tương đồng với rituximab). Tính chất quan trọng khác của kháng thể B-lyl nhân tính hoá đó là nó rất hiệu nghiệm trong thử nghiệm quần tụ cùng kiểu. Trong thử nghiệm này, các tế bào ở người dương tính với CD20, các tế bào Daudi, được ủ trong môi trường nuôi cấy tế bào cho tới 24 giờ ở 37°C trong khí CO₂ 5% trong lồng ấp tế bào động vật có vú như được mô tả chi tiết trong (Deans reference), với kháng thể ở nồng độ 1 microgam trên một ml và trong vi tuyến ở nồng độ 5 microgam trên ml. Để so sánh, đối chứng, quá trình ủ song song các tế bào được tiến hành trong các điều kiện giống nhau nhưng sử dụng kháng thể kháng CD20 C2B8. Tại các thời điểm khác nhau, bao gồm 8 giờ và 24 giờ của quá trình ủ, các tế bào được kiểm tra bằng mắt nhờ sử dụng kính hiển vi. Đã phát hiện ra rằng kháng thể B-lyl được nhân tính hoá dẫn đến quá trình quần tụ cùng kiểu, với các kết tụ lớn hơn đáng kể so với loại được kích thích bởi quá trình bổ sung kháng thể đối chứng C2B8. Ngoài ra, và thích hợp với kháng thể là kháng CD20 typ II, nó gây ra các mức chết tế bào cao hơn khi các tế bào ở người dương tính với CD20 được ủ bằng kháng thể được nhân tính hoá B-lyl, tỷ lệ với đối chứng trong các điều kiện giống nhau nhờ sử dụng kháng thể IgG1 dạng khảm C2B8 có trình tự tương đồng với rituximab.

Các thể biến dị xử lý glyco của các kháng thể được nhân tính hoá được tạo ra bằng cách đồng biểu hiện GnTIII glycosyltransferaza, cùng với các gen kháng thể, trong tế bào động vật có vú. Điều này làm tăng phần oligosacarit không fucosyl hoá gắn với vùng Fc của các kháng thể, kể cả các oligosacarit cắt đôi không fucosyl hoá, như được mô tả trong WO 2004/065540 (các Fig. 17- Fig. 19). Các kháng thể xử lý glyco có các mức gắn kết cao hơn đáng kể với các thụ thể FcγRIII ở người (Fig.20) và hoạt tính ADCC cũng được (Fig.16), tỷ lệ với kháng thể không xử lý glyco và tỷ lệ với kháng thể C2B8. Kháng thể được nhân tính hoá B-lyl cũng hiệu nghiệm hơn khi kích thích quá trình làm suy kiệt các tế bào B ở người trong toàn bộ thử nghiệm về máu (Fig.16) so với kháng thể đối chứng C2B8. Điều này đúng đối với cả kháng thể không xử lý glyco B-lyl và đối với kiểu xử lý glyco của nó. Kháng thể xử lý glyco hiệu nghiệm gấp 1000 kháng thể đối chứng kháng CD20 C2B8 khi

làm suy kiệt các tế bào B trong toàn bộ thử nghiệm máu. So sánh này là quan trọng đối với cả các dạng không xử lý glyco và xử lý glyco được nhân tính hoá của kháng thể B-lyl, vì nó chứng tỏ rằng trong các thử nghiệm kết hợp với các hoạt tính phụ thuộc thụ thể Fc, như ADCC, cùng với sự phân giải do nhóm bổ thể, cùng với sự gây chết tế bào, cả hai dạng đó của B-lyl đều hiệu nghiệm hơn đáng kể C2B8, mặc dù cả hai dạng của B-lyl có hoạt tính phân giải do nhóm bổ thể tạo ra thấp hơn nhiều. ADCC, hoạt tính diệt tế bào phụ thuộc thụ thể Fc và gây chết tế bào có mặt trong hoạt tính tốt hơn này của các biến thể kháng thể được nhân tính hoá B-lyl. Ngoài ra, trong thử nghiệm gây chết tế bào, cả hai dạng xử lý glyco và không xử lý glyco của kháng thể kháng CD20 typ II này đều hiệu nghiệm, với các thể biến dị được xử lý bằng Fc có ái lực gắn kết với các thụ thể Fc γ tăng còn hiệu nghiệm hơn so với thể biến dị không được xử lý bằng Fc khi kích thích quá trình tăng sinh quá mức, và với tất cả các thể biến dị có hiệu nghiệm hơn đáng kể so với kháng thể đối chứng C2B8. Cơ chế chính xác cho sự quần tụ cùng kiểu tăng cường và gây chết tế bào do các kháng thể kháng CD20 typ II tạo ra là chưa biết và gắn kết đồng phát với các phân tử khác trên bề mặt của các tế bào dương tính với CD20, như các thụ thể Fc, có thể tác động đến tính chất quan trọng này. Vì vậy, nó là quan trọng để chứng tỏ rằng các kháng thể kháng CD20 typ II được xử lý ở vùng Fc của chúng để làm tăng ái lực gắn kết với các thụ thể Fc γ , bao gồm Fc γ RIII và có mức gia tăng liên quan đến hoạt tính ADCC, vẫn có thể gây chết tế bào mạnh, thậm chí còn cao hơn không xử lý bằng Fc, và quá trình quần tụ cùng kiểu. Gây chết tế bào là quan trọng khi in vivo, khi các vị trí trong cơ thể nơi các tế bào đích dương tính với CD20 có thể được thấy, nhưng đường vào tới các tế bào dương tính với Fc γ RIII khó hơn nhiều trong máu, các vị trí đó là, ví dụ, các hạch bạch huyết. Ở các vị trí đó, sự gây chết tế bào bằng kháng thể kháng CD20 tự nó có thể là quyết định để có hiệu quả tốt của liệu pháp kháng thể kháng CD20 ở người, cả đối với việc điều trị các bệnh ác tính về máu như u lympho không Hodgkin và bệnh bạch cầu tế bào mạch huyết mãn tế bào B, và đối với việc điều trị các bệnh tự miễn dịch như viêm khớp dạng thấp và luput nhờ phương pháp làm suy kiệt tế bào B. Ái lực gắn kết với Fc γ RIII tăng

và ADCC cao hơn của kháng thể kháng CD20 typ II được xử lý bằng Fc, được nhân tính hoá cũng có thể là thuộc tính rất quan trọng đối với các liệu pháp này. Cuối cùng, hoạt tính phân giải do nhóm bổ thể tạo ra giảm hoặc không đáng kể của các kháng thể kháng CD20 typ II này, kể cả các thể biến dị được xử lý bằng Fc và được nhân tính hoá, cũng có thể có sự hoạt hoá bổ trợ quan trọng cao hơn do các kháng thể kháng CD20 tương quan với các tác dụng phụ không mong muốn, tăng.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Polynucleotit phân lập chứa:

a) trình tự mã hóa polypeptit có trình tự được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO:40; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:56; và SEQ ID NO:60; và

b) trình tự mã hóa polypeptit có trình tự của SEQ ID NO:76.

2. Chế phẩm chứa polynucleotit thứ nhất phân lập mã hóa polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40, và polynucleotit thứ hai phân lập mã hóa polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:76.

3. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro chứa polynucleotit thứ nhất mã hóa polypeptit có vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:40, và polynucleotit thứ hai mã hóa polypeptit chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch bao gồm trình tự axit amin của SEQ ID NO:76.

4. Polynucleotit phân lập theo điểm 1, trong đó polypeptit theo a) có trình tự của SEQ ID NO:40.

5. Polynucleotit phân lập theo điểm 1, trong đó trình tự mã hóa polypeptit theo a) còn mã hóa vùng Fc của người.

6. Polynucleotit phân lập theo điểm 5, trong đó vùng Fc của người này là vùng IgG Fc của người.

7. Chế phẩm theo điểm 2, trong đó polynucleotit thứ nhất này còn mã hóa vùng Fc của người.

8. Chế phẩm theo điểm 7, trong đó vùng Fc của người này là vùng IgG Fc của người.

9. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 3, trong đó polynucleotit thứ nhất này còn mã hóa vùng Fc của người.

10. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 9, trong đó vùng Fc của người này là vùng IgG Fc của người.

11. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 3, trong đó tế bào chủ này là tế bào động vật có vú hoặc tế bào nấm men.

12. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 3, trong đó tế bào chủ này là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO: Chinese hamster ovary).

13. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro chứa:

a) polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin được chọn từ nhóm gồm có SEQ ID NO:40; SEQ ID NO:32; SEQ ID NO:56; và SEQ ID NO:60; và

b) polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO:76.

14. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 13, trong đó polynucleotit theo a) mã hóa polypeptit chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO:40.

15. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 13, trong đó polynucleotit theo a) còn mã hóa vùng Fc của người.

16. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 15, trong đó vùng Fc của người này là vùng IgG Fc của người.

17. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 13, trong đó tế bào chủ này là tế bào động vật có vú hoặc tế bào nấm men.

18. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 13, trong đó tế bào chủ này là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO: Chinese hamster ovary).
19. Tế bào chủ nuôi cấy in vitro theo điểm 13, trong đó tế bào chủ này sản sinh kháng thể được mã hóa bởi các polynucleotit theo a) và b).
20. Tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc chứa polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO:40, và polynucleotit mã hóa polypeptit có trình tự axit amin của SEQ ID NO:76.
21. Tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc theo điểm 20, trong đó tế bào này sản sinh kháng thể được mã hóa bởi các polynucleotit này.
22. Vật truyền biểu hiện chứa polynucleotit bao gồm:
- a) trình tự mã hóa polypeptit có trình tự của SEQ ID NO:40; và
 - b) trình tự mã hóa polypeptit có trình tự của SEQ ID NO:76.

Mỗi nối| Bắt đầu bằng SEQ ID NO:1 (axit amin) và SEQ ID
NO:2 (nucleotit)

```

1  GAGGTCAAGC TGCAGCAGTC T|GGACCTGAA CTGCTGAAGC CTGGGGCCTC AGTCAAGATT TCCTGCAAG CTTCGGCTA CGCATTCACT TACTCTTGA
  CTCCAGTTCC AGTGTCTCAG A|CCTGGACTT GACCACTTCC GACCCCGGAG TCACCTCTAA AGGAGTTTC GAAGACGGAT GGTAAAGTCA ATGAGAACCT
    E V K L Q Q S | G P E L V K P G A S V K I S C K A S G Y A F S Y S W
  >>.....B-Ly1 vh.....>

101 TGAAGTGGT GAAAGTGGG CCTGGACAGG GTCTTGAGTG GATTGACGG ATTTTCCTG GAGATGGGA TACTGACTAC AATGGGAAAT TCAAGGCCAA
  ACTTGACCCA CTITGACTCC GGACCTGTCC CAGAACTCAC CTAACCTGCC TAAAAAGGAC CTCTACCCCT ATGACTGATG TTACCCITTA AGTTCCCGTT
    M N W V K L R P G Q G L E W I G R I F P G D G D T D Y N G K F K G
  >.....B-Ly1 vh.....>

201 GGCCACACTG ACTGCTGACA AATCCTCCAA CACAGCCTAC ATGCAACTCA CCAGCCTGAC CTCTGTGGAC TCTGGGTCT ATTTATGTGC AAGAAATGTC
  CCGGTGTGAC TGACCACTGT TTAGGAGGTT GTGTGGGATG TACSTTGAGT GGTGGGACTG GAGACACCTG AGACCCAGA TAAATACAGS TTCTTTACAG
    K A T L T A D K S S N T A Y M Q L T S L T S V D S A V Y L C A R N V
  >.....B-Ly1 vh.....>

301 TTTGATGGT ACTGGTTAGT TTACTGGGGC CAAGGGACTC TGGTCACTGT CTCTCCA
  AAACACCAA TGACCAATCA AATGACCCCG GTTCCCTGAG ACCAGTGACA GAGACGT
    F D G Y W L V Y W G Q G T L V T V S A
  >.....B-Ly1 vh.....>

```

FIG.1

Mỗi nối| Bắt đầu bằng SEQ ID NO:3 (axit amin) và SEQ ID
NO:4 (nucleotit)

```

      HphI                                     MspI
1  CACATTGTGC TCACCCAAAC TACA|AATCCA GTCAGTCTTG GAACATCAGC TTCCATCTCC TGCAGGTCTA GTAAGAGTCT CCTACATAGT AATGSCATCA
   CTGTAACAGC AGTGGGTTTG ATGT|TTAGGT CAGTGAGAAC CTGTAGTCCG AAGGTAGAGG AGGTCCAGAT CATTCTCAGA GGATGTATCA TTACGCTAGT
   D I V L T Q T T I N P V T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I
>>.....B-LyI v.l.....>

      BseRI                                     MneI
101 CTTATTGTGA TTGCTATCTG CAGAAGCCAG GCCAGTCTCC TCAGCTCCTG ATTTATCAGA TGTCGAACCT TGTCTCAGGA GTCCGAGACA GGTTCAGTAG
    GAATAACAT AACCATAGAC GTCTTCGCTC CGTCAGAGG AGTCGAGGAC TAAATAGTCT ACAAGTTGGA ACAGAGTCTT CAGGCTCTGT CCAAGTCATC
    T Y L Y W Y L Q K P G Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V P D R F S
>.....B-LyI v.l.....>

      BtsI                                     AflIII
201 CAGTGGGTCA GGAAGTATT TCACACTGAG AATCAGCAGA GTGGAGGCTG AGCATGTGGG TGTTTATTAC TGTGCTCAAA ATCTAGAACT TCGGTACAGG
    GTCAACCACT CTTGACTAA AGTGTGACTC TTAGTGTCT CACCTCGGAC TCCTACACCC ACAATAATG ACAGAGTCTT TAGATCTTGA AGGCATGTCC
    S S G S G T D F T L R I S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P Y T
>.....B-LyI v.l.....>

301 TTCGAGGGG GGAACAGCT GGAATAAAA CGC
    AAGCCTCCCC CCGGTTCSA CTTTATTTT GCC
    F G G G T K L E I K R
>.....B-LyI v.l.....>

```

FIG.2

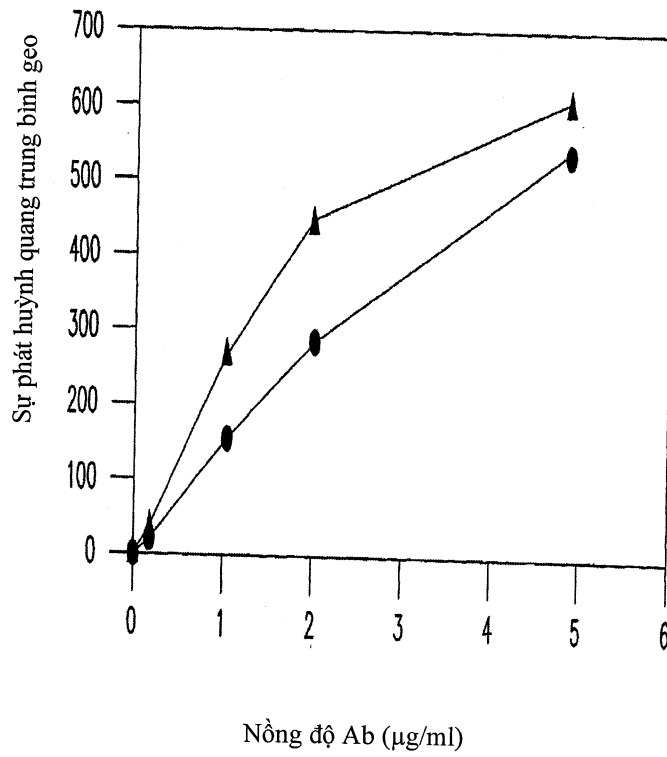


FIG.3

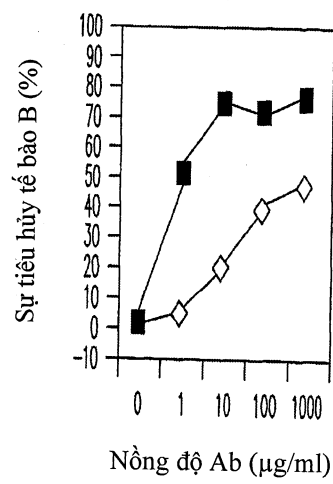


FIG.4A

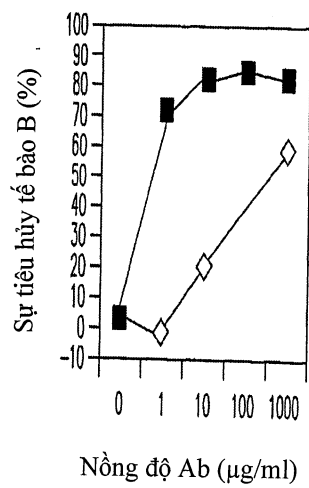


FIG.4B

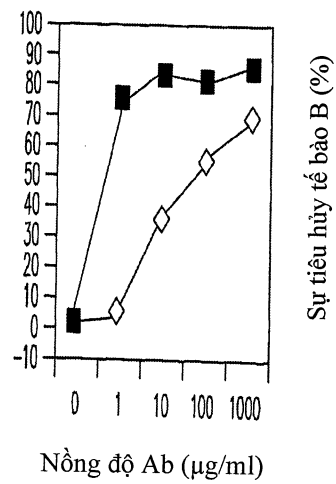


FIG.4C

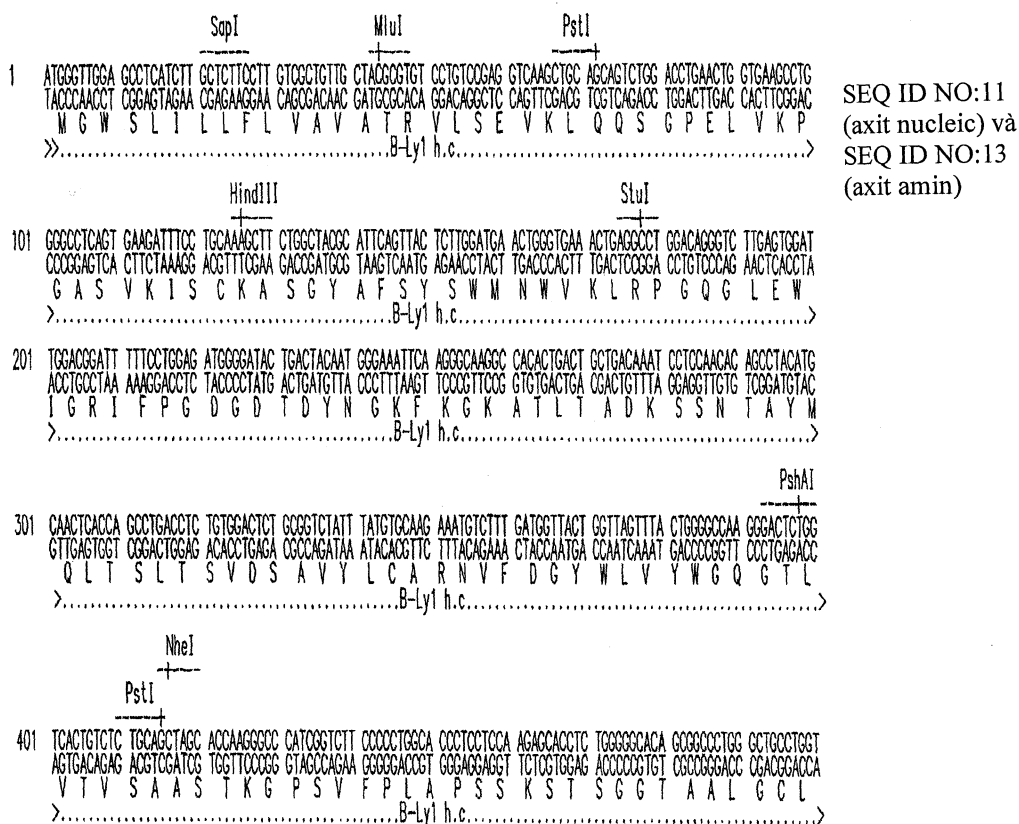


FIG.5A

501 CAAGGACTAC TTCCCGAAG CCGTGACGGT GTCTGGAAC TCAGCGGCCG TGACCAGCGG CGTGCACACC TTCCCGGCTG TCCTACAGTC CTCAGGACTC
 GTTCTGATG AAGGGGCTTG GCACTGCCA CAGCAGCTTG AGTCGCGGG ACTGCTGGCC GCAGGTGTGG AAGGGCGGAC AGGATCTCAG GAGTCTCGAG
 V K D Y F P E P V T V S W N S G A L T S G V H T F P A V L Q S S G L
 >.....B-Lyl h.c.....>

601 TACTCCCTCA GCAGCGTGGT GACCGTGCCC TCACGAGCT TGGGCACCCA GACCTACATC TGCAACGTGA ATCACAAGCC CAGCAACACC AAGGTGGACA
 ATGAGGGAGT CGTGCACCA CTGGCAGGG AGGTGCTGA ACCCGTGGGT CTGGATGTAG ACCTTGCACT TAGTGTTCGG GTCTTGTGG TTCCAGCTGT
 Y S L S S V V I V P S S S L G T Q T Y I C N V N H K P S N T K V D
 >.....B-Lyl h.c.....>

Ahd1
 -----+-----

701 AGAAGCAGA GCGCAATCT TGTGACAAA CTCACATG CCGACCGTGC CGACACCTG AACCTCTGG GGGACCGTCA GTCTTCTCT TCGCCCAAAA
 TCTTCTCT CCGGTTTGA ACAGTGTIT GAGTGTGTAC GGTGGCAGG GGTGCTGGAC TTCAGGACCC CCGTGGCAGT CAGAAGGAGA AGGGGGTTT
 K K A E P K S C D K T H T C P P C P A P E L L G G P S V F L F P P
 >.....B-Lyl h.c.....>

801 ACCCAAGGAC ACCCTCATGA TCTCCCGGAC CCGTGAGGTG ACATGCGTGG TGCTGACGT GAGCCAGGAA GACCGTGAG TCAAGTTCAA CTGCTACGTG
 TGGGTTCTG TGGAGTACT AGAGGGCTG GGGACTCAG TGTAGCACC ACCAGCTGCA CTGGTGCTT CTGGGACTCC AGTTCAAGTT GACCATGCAC
 K P K D T L M I S R T P E V T C V V V D V S H E D P E V K F N W Y V
 >.....B-Lyl h.c.....>

901 GAGCGCGTGG AGGTGCATAA TGCCAAGACA AAGCGCGGG AGGAGCAGTA CAACAGCAGG TACCGTGG TCAGCGTCTT CACCGTCTG CACGAGGACT
 CTGCGGACCC TCACGATTAT ACAGTTCTGT TTGCGCGGCC TCCTGCTCAT GTTGCTGCG ATGGCAGACC AGTGCAGGA GTGCGAGGAC GTGCTCTGA
 D G V E V H N A K T K P R E E Q Y N S T Y R V V S V L T V L H Q D
 >.....B-Lyl h.c.....>

1001 GCGTGAATGG CAAGGAGTAC AAGTCAAGG TCTCCAACAA AGCCCTCCCA GCGCCCATGG AGAAAACAT CTCCAAAGCC AAAGGGCAGC CCGAGAACCC
 CCGACTTACC GTTCTCATG TTCAGGTTCC AGAGTTGTT TGGGAGGGT CCGGGGTAGC TCTTTTGTA CAGGTTTCGG TTTCGCGTGG GGGCTCTTGG
 W L N G K E Y K C K V S N K A L P A P I E K T I S K A K G Q P R E
 >.....B-Lyl h.c.....>

SEQ ID NO:11
 (axit nucleic) và
 SEQ ID NO: 13
 (axit amin)

FIG.5B

SmaI
+

1101 ACAGGTGTAC ACCCTGCCCC CATCCCGGA TGAGCTGACC AAGAACCAGG TCAGCCTGAC CTGCTGGTC AAAGGTTCT ATCCAGCSA CATCCCGTG
 TGTCACATG TGGACGGGG GTAGGCCCT ACTGACTGG TTCTTGTTC AGTGGACTG GACGGACCAG TTTCGAGA TAGGTCGCT GTAGCGGAC
 P Q V Y T L P P S R D E L T K N Q V S L T C L V K G F Y P S D I A V
 >.....B-Ly1 h.c.....>

1201 GAGTGGAGA GCAATGGGA GCGGAGAAC AACTACAAG CCAAGCCTCC CGTCTGGAC TCCGAGGCT CCTTCTTCT CTACAGCAAG CTCACCGTG
 CTCACCTCT CATTACCGT CGGCTCTTG TTGATTTCT GGTGGGAGG GCAAGCCTG AGGCTGCCA GGAAGAAGA GATGCTTC GAGTGGCACC
 E W E S N G Q P E N N Y K T T P P V L D S D G S F F L Y S K L T V
 >.....B-Ly1 h.c.....>

SapI

1301 ACAAGAGCAG GTGGCAGCAG GGAAGCTCT TCTCATGTC CGTGATCAT GAGGCTCTG ACAACCACTA CAGCAGAG AGCCTCTCC TGTCTCGGG
 TGTCTCGTC CAGCGTCTC CCTTGCAGA AGAGTACGAG GCACTACCTA CTCCGAGAG TGTGTGAT GTGGTCTTC TGGAGAGGG ACAGAGGDC
 D K S R W Q Q G N V F S C S V M H E A L H N H Y T Q K S L S L S P
 >.....B-Ly1 h.c.....>

1401 TAAATGA
 ATTACT
 G K -
 >....>> B-Ly1 h.c.

SEQ ID NO:11 (axit
 nucleic) và
 SEQ ID NO: 13 (axit
 amin)

FIG.5C

1 ATGGATTTTC AGGTGCAGAT TATCAGCTTC CTGCTAATCA GTGCTTCAGT CATAATGTCC AGAGGAGACA TTGTGCTCAG CCAAACTACA AATCCAGTCA
TACCTAAAAG TCCACCTCTA ATAGTCGAAG GACGATTAGT CAGGAAGTCA GTATTACAGG TCTCCTCTGT AACACGAGTG GGTTCATGT TTAGGTCAGT
M D F Q V Q I I S F L L I S A S V I M S R G D I V L I Q T T N P V
>>.....B-Ly1 I.c.....>

101 CTCTCGAAG ATCAGCTTCC ATCTCCTCCA GGTCTAGTAA GAGTCTCCTA CATAAGTATG GCATCAGTTA TTTGTATTGG TATCTGCAGA AGCCAGGGCA
GAGAACCTTG TAGTCGAAGG TAGAGGACGT CCAGATCATT CTCAGAGGAT GTATCATTAC CGTAGTGAAT AAACATAACC ATAGAGCTCT TCGGTCGGGT
T L G T S A S I S C R S S K S L L H S N G I T Y L Y W Y L Q K P G
>.....B-Ly1 I.c.....>

201 GTCTCCTCAG CTCCTGATTT ATCAGATGTC CAACCTTGTC TCAGGAGTCC CAGACAGSTT CAGTACAGT GGGTCAGGAA CTGATTTTAC ACTGAGAATC
CAGAGGAGTC GAGGACTAAA TAGTCTACAG GTTGAACAG AGTCTCAGG GTCTGTCCAA CTCATCSTCA CCGAGTCTT GACTAAAGTG TGACTCTTAC
Q S P Q L L I Y Q M S N L V S G V P D R F S S S G S G T D F T L R I
>.....B-Ly1 I.c.....>

301 AGCAGAGTGG AGCGTGAGGA TGTGGGTGT TATTACTGTG CTCAAAATCT AGAAGTTCCG TACAGSTTCC GAGCGGGGAC CAAGCTGCAA ATAAAGCTA
TGTCTCACC TCCGACTCCT ACACCCACAA ATAATGACAC GAGTTTITAGA TCTGAAGGC ATGTGCAAGC CTCGCGCTG GTTCGACCTT TATTTTGCAT
S R V E A E D V G V Y Y C A Q N L E L P Y T F G G G I K L E I K R
>.....B-Ly1 I.c.....>

401 CGGTGGCTGC ACCATCTGTC TTGATCTTCC CCCCCTCTGA TGAGCAGTTG AAATCTGAAA CTGCTCTGT TGTGTGCTG CTGAATAACT TCTATCCGAG
GCCACCGAGG TGGTAGACAG AAGTAGAAGG GCGGTAGACT ACTGCTCAAC TTTAGACCTT GACCGAGACA ACACACGGAC GACTTATTGA AGATAGGCTC
T V A A P S V F I F P P S D E Q L K S G T A S V V C L L N N F Y P
>.....B-Ly1 I.c.....>

501 AGAGGCCAAA GTACAGTGGG AGGTGGATAA GCGGCTCCAA TCGGGTAAGT CCGAGGAGAG TGTACAGAG CAGGACAGCA AGGACAGCAC CTACAGCCTC
TCTCGGTTT CATGTCAAGT TCCACCTATT GCGGAGSTT AGCCCATTTA GGGTCTCTC ACAGTGTCTC GTCTGTCTG TCTGTCTG GATGTGGGAG
R E A K V Q W K V D N A L Q S G N S Q E S V T E Q D S K D S T Y S L
>.....B-Ly1 I.c.....>

SEQ ID NO:12 (axit
nucleic) và
SEQ ID NO: 14
(axit amin)

FIG.6A

SacI
+

```

601 AGCAGCACC TGAGGCTGAG CAAAGCAGAC TACGAGAAAC ACAAGTCTA CCGCTGGGAA GTCACCATC AGGCGCTGAG CTGCGCGTC ACAAGAGCT
TCTGTGTGGG ACTGGGACTC GTTTCGTCTG ATGCTCTTTG TTTTCAGAT GCGGAGCCTT CAGTGGGTAG TCCCGGACTC GAGCGGCGAG TTTTCTCGA
S S T L T L S K A D Y E K H K V Y A C E V T H Q G L S S P V T K S
>.....B-Ly1 l.c.....>
701 TCAACAGGGG AGAGTGTAG
AGTTGTCCCG TCTCACAATC
F N R G E C -
>....B-Ly1 l.c.....>

```

SEQ ID NO:12
(axit nucleic) và
SEQ ID NO: 14
(axit amin)

FIG.6B

CDR1(Kabat):	
TACTCTTGGATGAAC	SEQ ID NO: 5
TyrSerTrpMetAsn	SEQ ID NO: 15
CDR1(Chothia):	
GGCTACGCATTCACTTAC	SEQ ID NO: 6
GlyTyrAlaPheSerTyr	SEQ ID NO: 16
CDR1(AbM):	
GGCTACGCATTCACTTACTCTTGGATGAAC	SEQ ID NO: 7
<u>GlyTyrAlaPheSerTyrSerTrpMetAsn</u>	SEQ ID NO: 17
CDR2(Kabat):	
CGGATTTTCTCGAGATGGGATACTGACTACAATGGGAAATCAAGGGC	SEQ ID NO: 21
ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAspTyrAsnGlyLysPheLysGly	SEQ ID NO: 25
CDR2(Chothia):	
TTTCTCGAGATGGGATACTGAC	SEQ ID NO: 22
PheProGlyAspGlyAspThrAsp	SEQ ID NO: 26
CDR2(AbM):	
CGGATTTTCTCGAGATGGGATACTGAC	SEQ ID NO: 23
<u>ArgIlePheProGlyAspGlyAspThrAsp</u>	SEQ ID NO: 27
CDR3(Kabat, Chothia, AbM):	
AATGTCTTGTATGGTTACTGGTTAGTTTAC	SEQ ID NO: 24
AsnValPheAspGlyTyrTrpLeuValTyr	SEQ ID NO: 28

FIG.7A

CDR1(Kabat):	
AGGTCTAGTAAGAGTCTCCTACATAGTAATGGCATCACTTATTTGTAT	SEQ ID NO: 8
ArgSerSerLysSerLeuLeuHisSerAsnGlyIleThrTyrLeuTyr	SEQ ID NO: 18
CDR2(Kabat):	
CAGATGTCCAACCTTGCTCA	SEQ ID NO: 9
GlnMetSerAsnLeuValSer	SEQ ID NO: 19
CDR3(Kabat):	
GCTCAAAATCTAGAACTTCCGTACACG	SEQ ID NO: 10
AlaGlnAsnLeuGluLeuProTyrThr	SEQ ID NO: 20

FIG.7B

1. tỷ lệ tương đối

	Bly-1 ml 031024 016	+ EndoH Bly-1 ml 031024 017
1053		
1256		
1282		
1298		3.70%
1339	18.60%	17.90%
1460		4.30%
1486	5.90%	5.50%
1502	5.10%	3.70%
1543	35.00%	39.20%
1622		
1647	4.60%	3.00%
1664	7 %	
1680		
1688	11.00%	10.30%
1705	7.20%	7.30%
1810		
1826		
1850	5.90%	5.20%
1972		
2012		
	100%	100%

FIG.8A

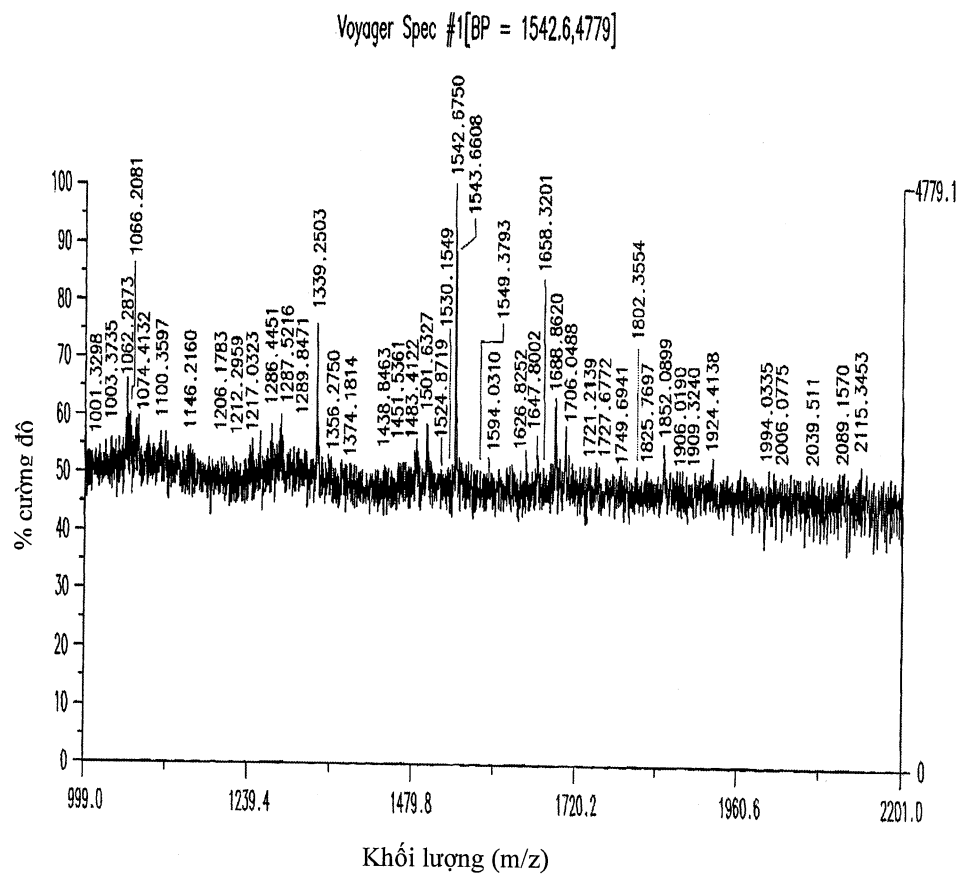


FIG.8B

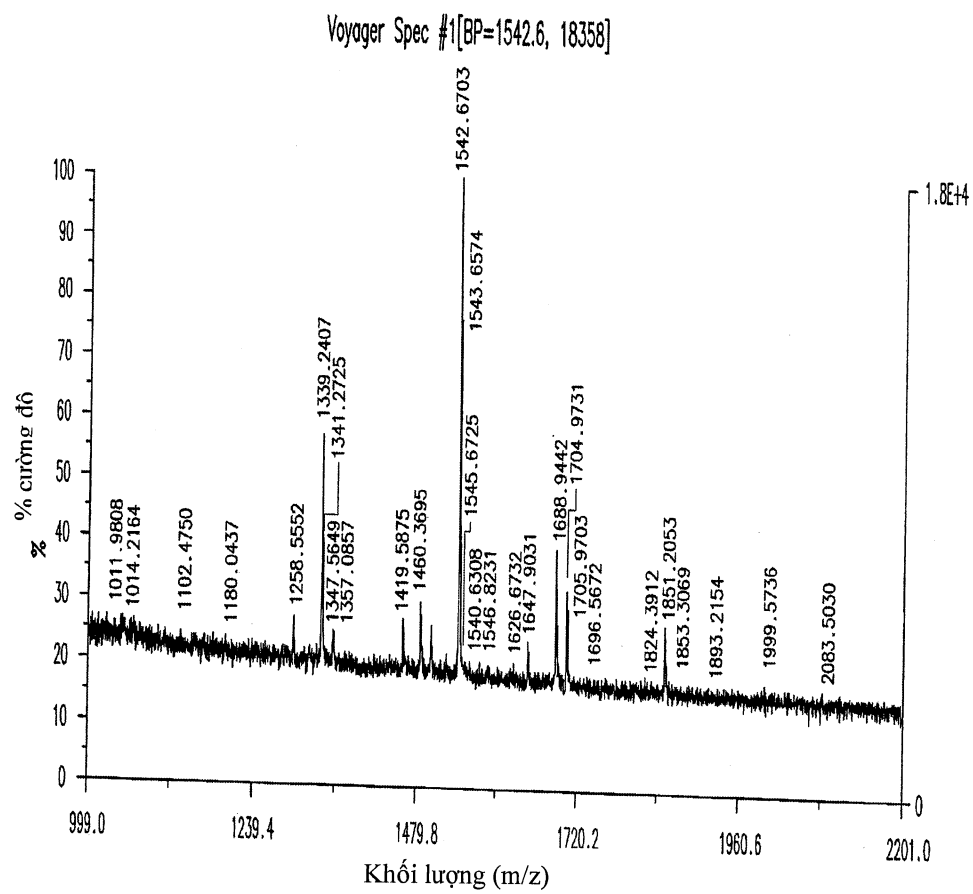


FIG.8C

Sự gắn kết của các kháng thể kháng
CD20 được nhân hóa khác nhau với
các tế bào Raji B

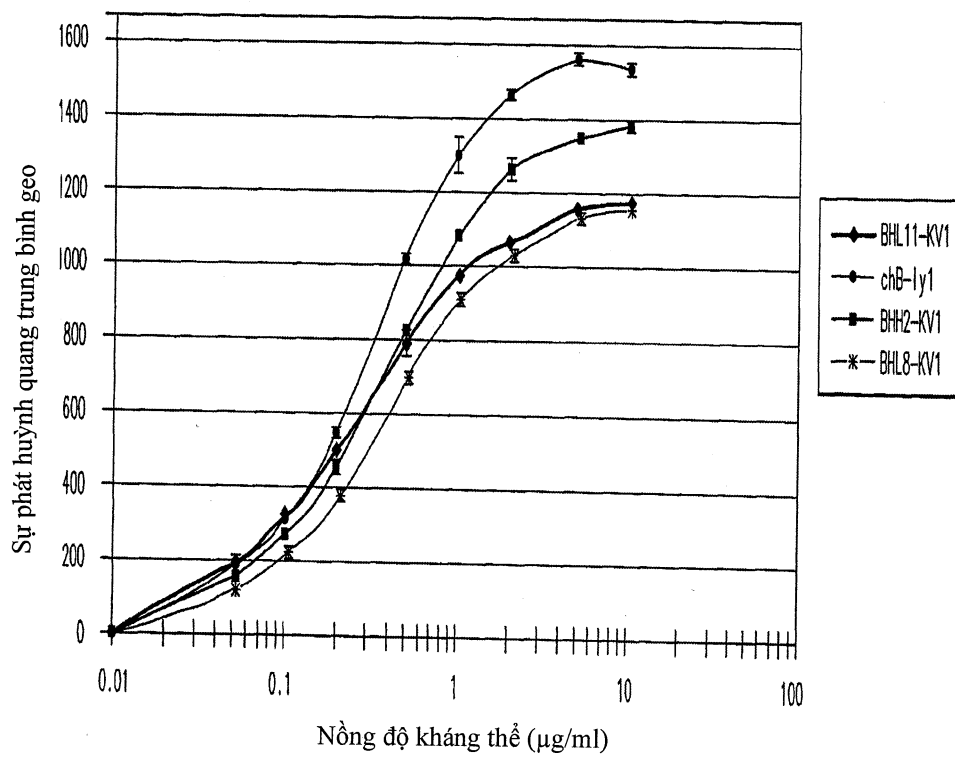


FIG.9

Sự gắn kết của các kháng thể kháng
CD20 được nhân hóa khác nhau với
các tế bào Raji B

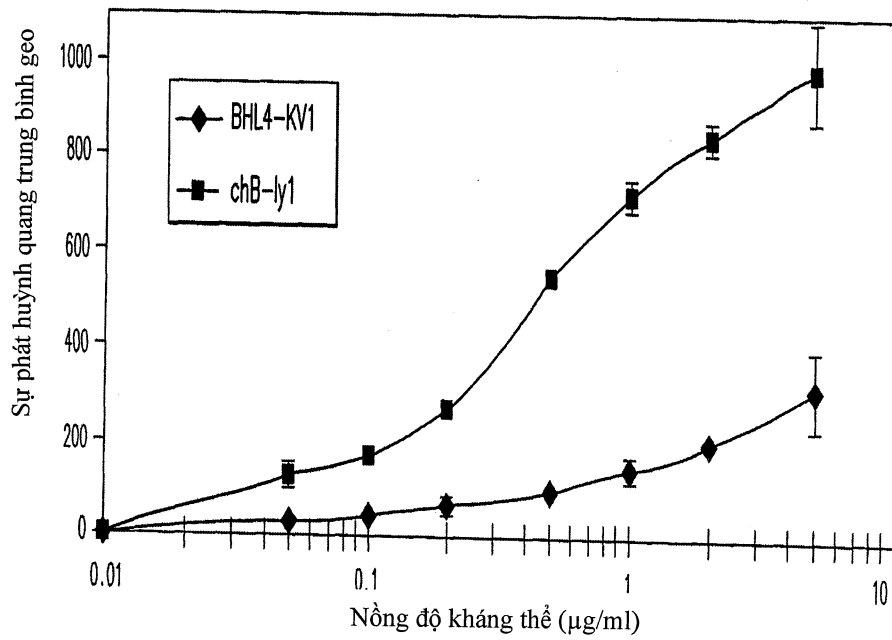


FIG.10

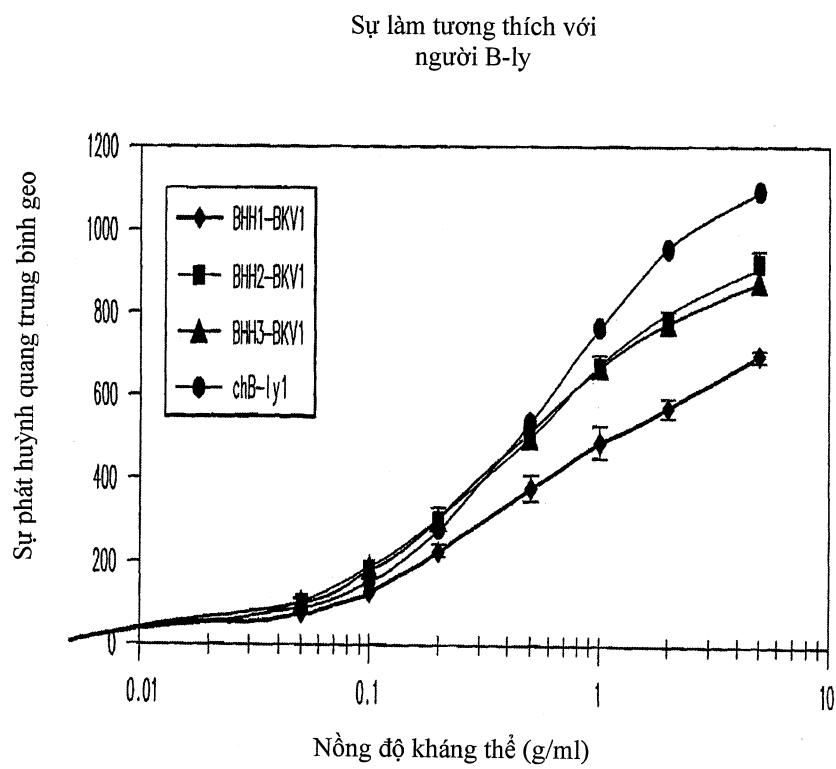


FIG.11

Nhân tính hóa B-ly1

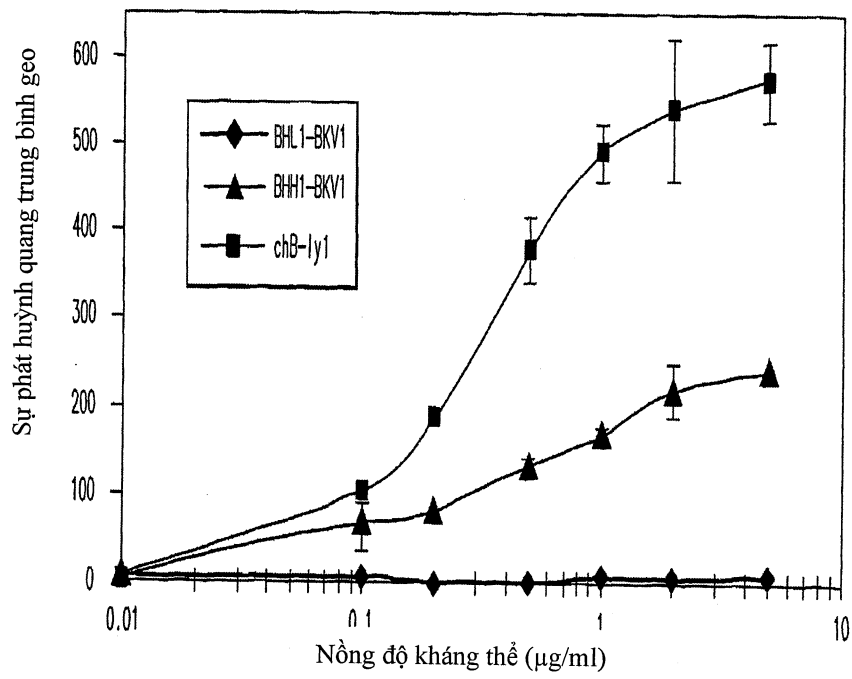


FIG.12

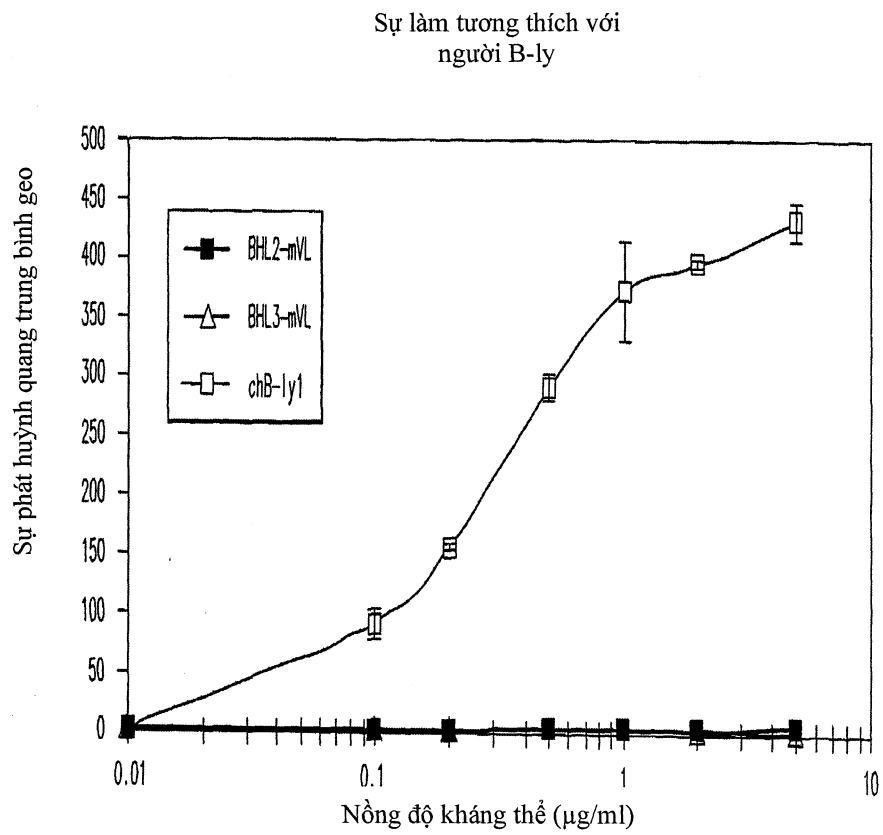


FIG.13

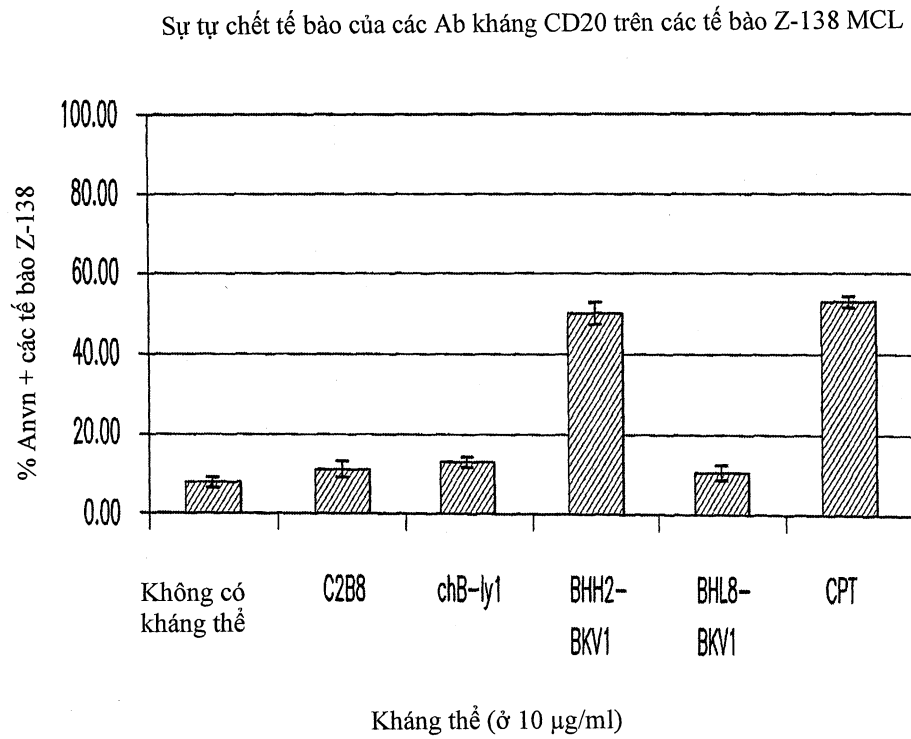


FIG.14

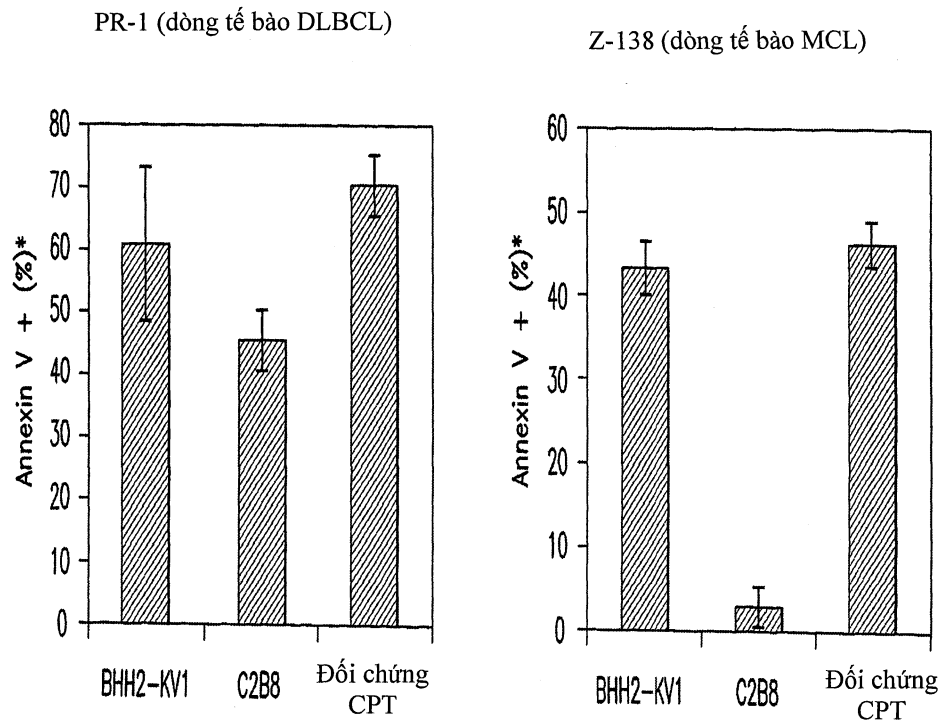


FIG.15

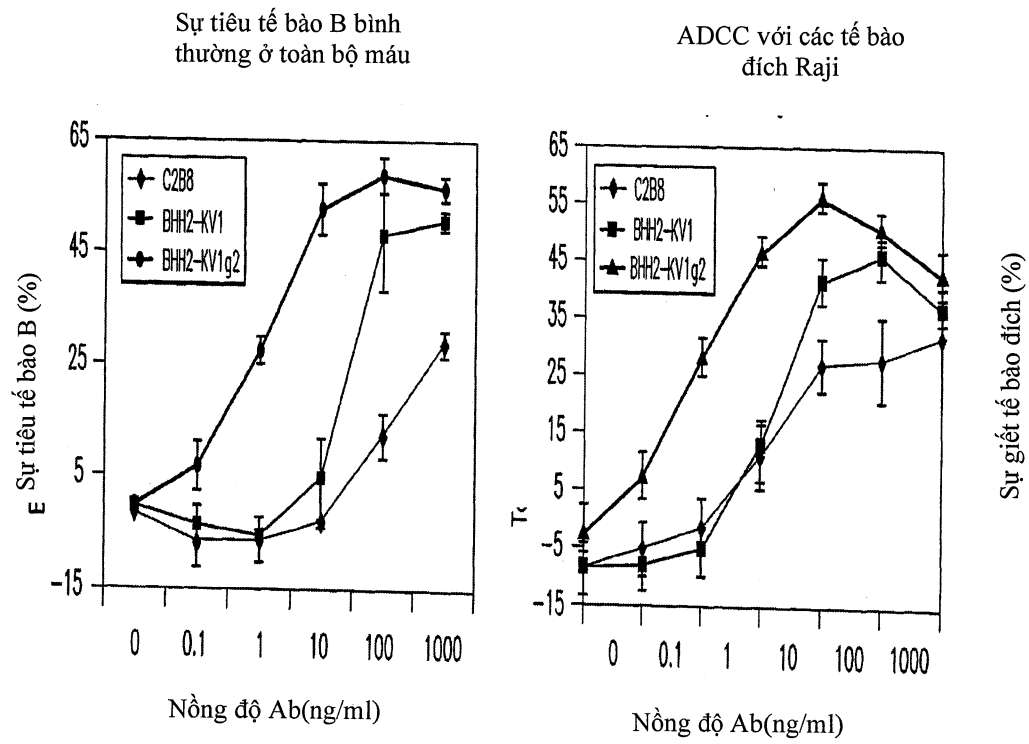


FIG.16

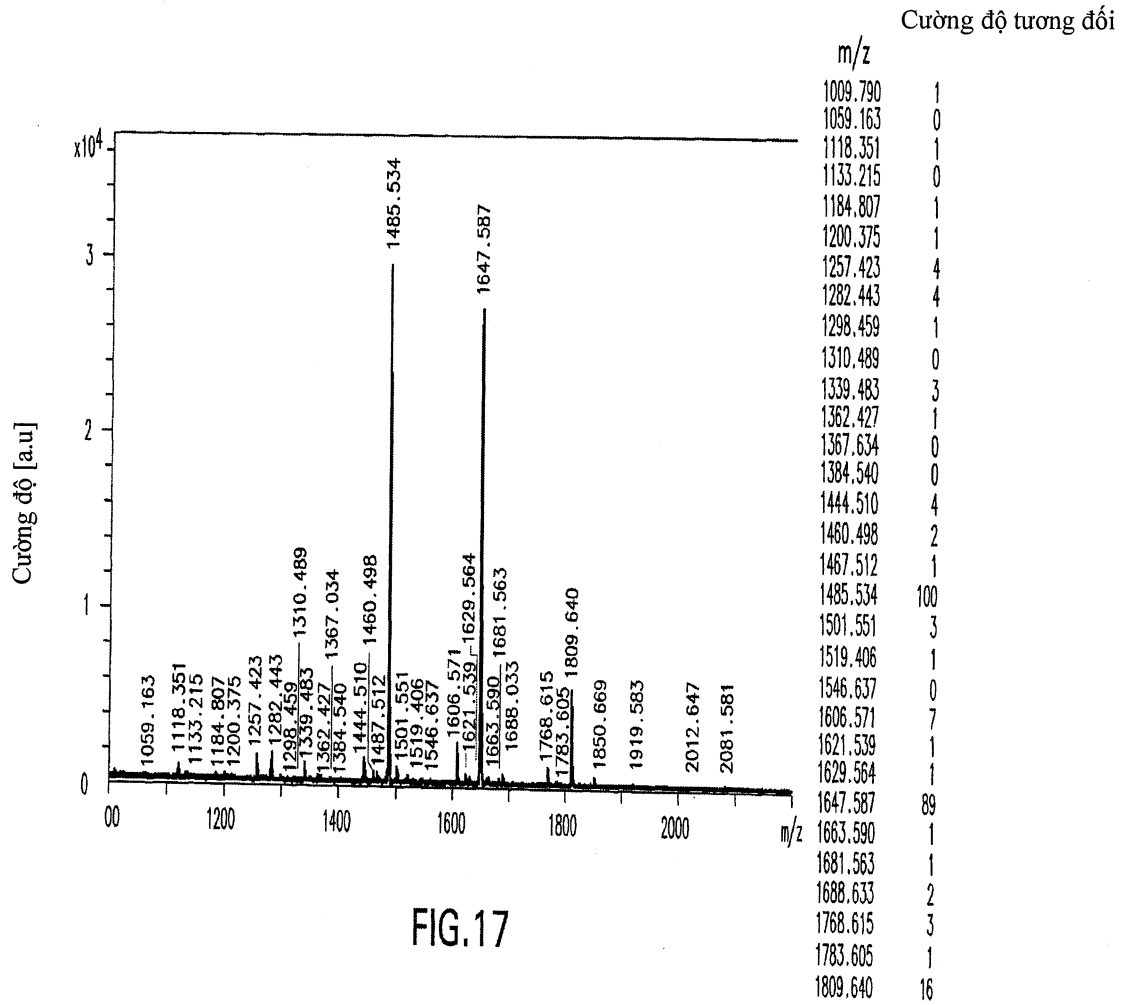


FIG.17

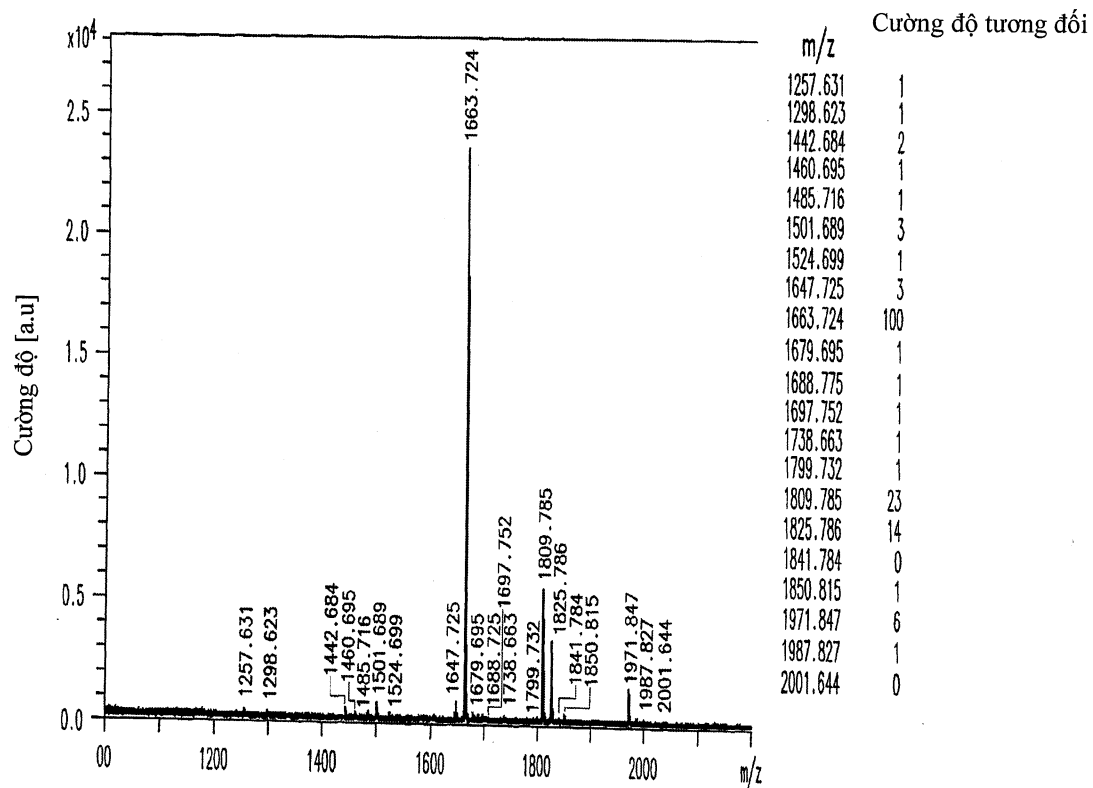


FIG.18

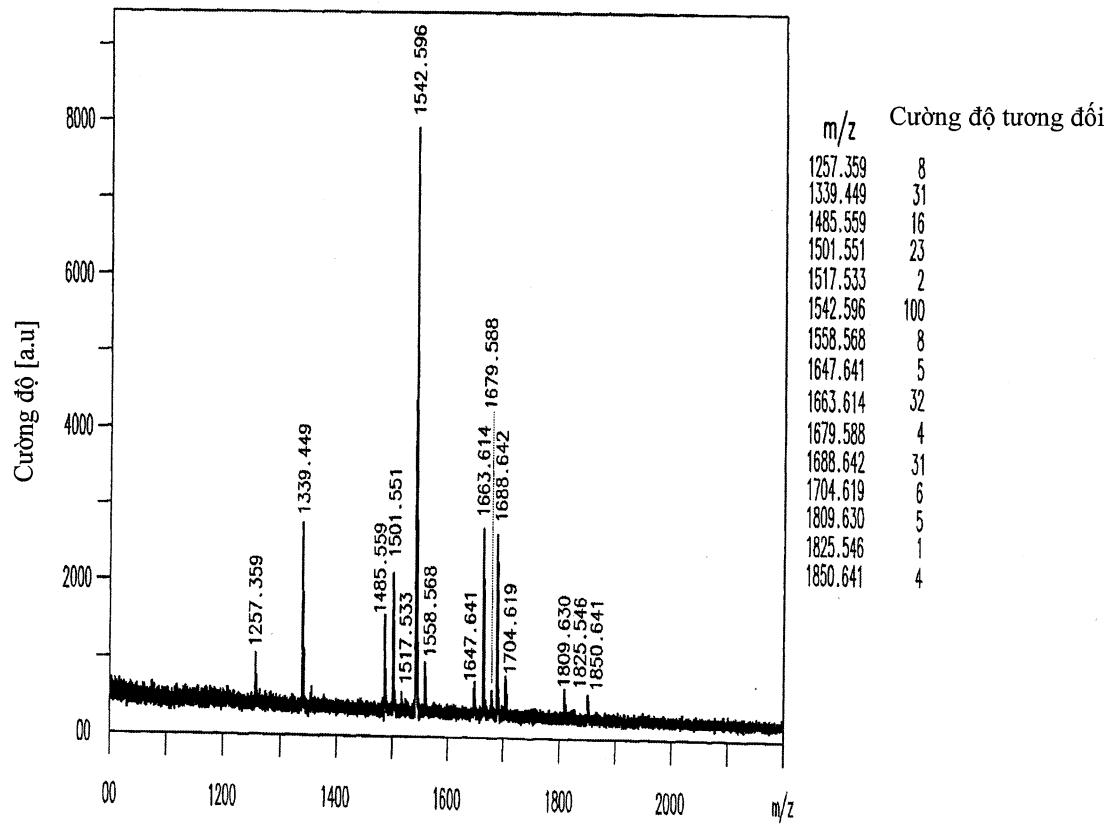


FIG.19

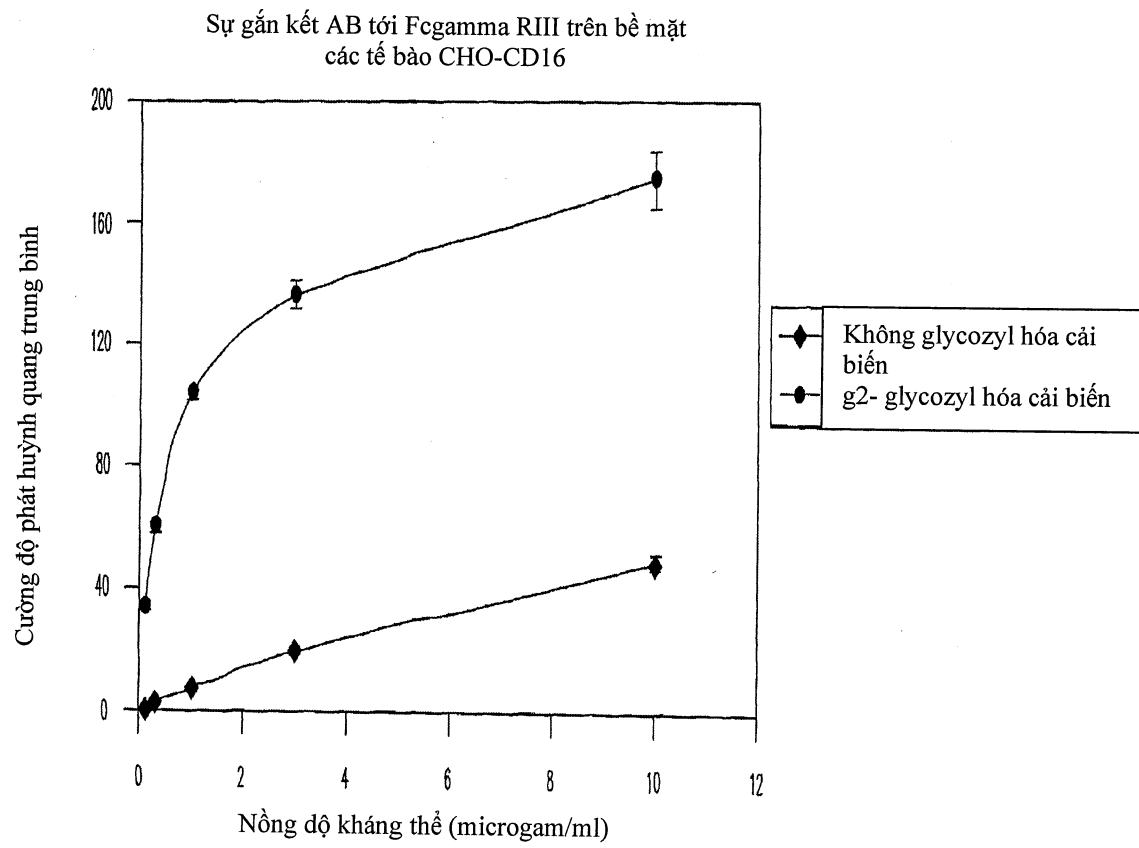


FIG.20

Sự tự chết của tế bào bởi Abs kháng 20
Dòng tế bào hạch bạch huyết tế bào vỏ
biểu bì Z-138

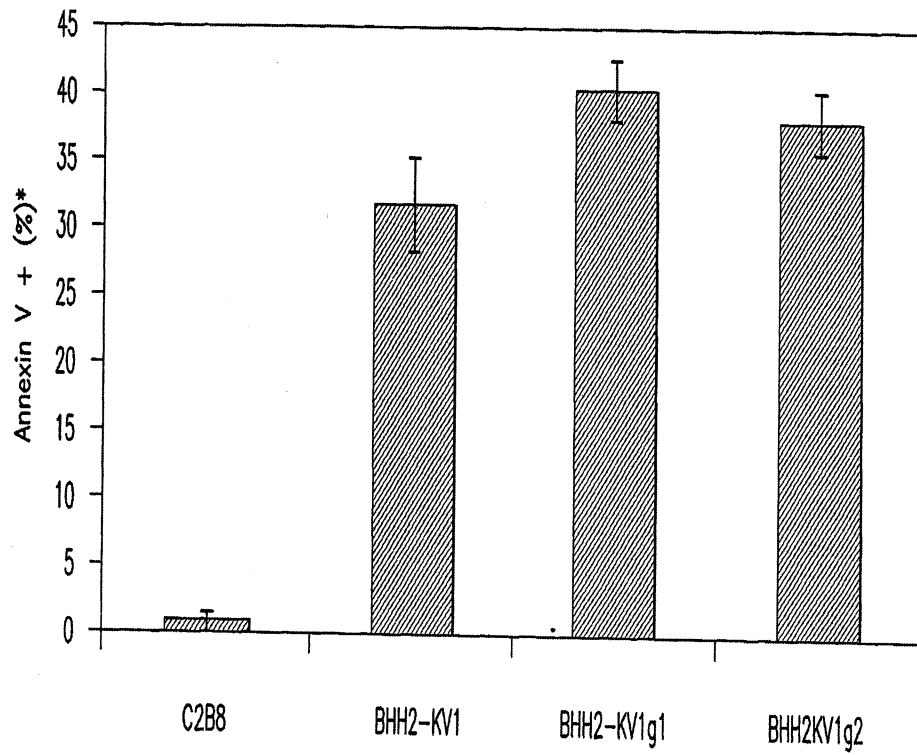


FIG.21

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> GlycArt Biotechnology AG
 Umana, Pablo
 Bruenker, Peter
 Suter, Tobias
 Puentener, Ursula
 Moessner, Ekkehard
 Ferrara, Claudia

<120> Polynucleotit phân lập, chế phẩm, vật truyền biểu hiện và tế bào chủ nuôi cấy in vitro chứa polynucleotit phân lập

<130> 1975.029PC01

<160> 78

<170> PatentIn version 3.3

<210> 1

<211> 112

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 1

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

Ala Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu
 20 25 30

Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp
 35 40 45

Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr
 50 55 60

Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr
 65 70 75 80

Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly
 85 90 95

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

<210> 2

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 2

ggacctgaac tgggtgaagcc tggggcctca gtgaagattt cctgcaaagc ttctggctac 60

gcattcagtt actcttggat gaactgggtg aaactgaggg ctggacaggg tcttgagtgg 120
 attggacgga tttttcctgg agatggggat actgactaca atgggaaatt caagggcaag 180
 gccacactga ctgttgacaa atcctccaac acagcctaca tgcaactcac cagcctgacc 240
 tctgtggact ctgcggtcta tttatgtgca agaaatgtct ttgatgggta ctggtagtt 300
 tactggggcc aagggactct ggtcactgtc tctgca 336

<210> 3
 <211> 103
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 3

Asn Pro Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser
 1 5 10 15

Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu
 20 25 30

Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn
 35 40 45

Leu Val Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr
 50 55 60

Asp Phe Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val
 65 70 75 80

Tyr Tyr Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly
 85 90 95

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100

<210> 4
 <211> 309
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 4
 aatccagtca ctcttggaaac atcagcttcc atctcctgca ggtctagtaa gagtctccta 60
 catagtaatg gcatcactta tttgtattgg tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag 120
 ctcttgatatt atcagatgtc caaccttgtc tcaggagtcc cagacagggt cagtagcagt 180
 gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc agcagagtgg aggctgagga tgtgggtgtt 240

tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg tacacgttcg gaggggggac caagctggaa 300

ataaaaacgg 309

<210> 5
 <211> 15
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 5
 tactcttgga tgaac 15

<210> 6
 <211> 18
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 6
 ggctacgcat tcagttac 18

<210> 7
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 7
 ggctacgcat tcagttactc ttggatgaac 30

<210> 8
 <211> 48
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 8
 aggtctagta agagtctcct acatagtaat ggcatacatt atttgtat 48

<210> 9
 <211> 21
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 9
 cagatgtcca accttgtctc a 21

<210> 10
 <211> 27
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 10
 gctcaaaatc tagaacttcc gtacacg 27

<210> 11
 <211> 1407

<212> ADN

<213> cADN ghép chuột-người

<220>

<223> cADN ghép chuột-người

<400> 11

```

atgggttgga gcctcatctt gctcttcctt gtcgctgttg ctacgcgtgt cctgtccgag      60
gtcaagctgc agcagtctgg acctgaactg gtgaagcctg gggcctcagt gaagatttcc      120
tgcaaagctt ctggctacgc attcagttac tcttgatga actgggtgaa actgaggcct      180
ggacagggtc ttgagtggat tggacggatt tttcctggag atggggatac tgactacaat      240
gggaaattca agggcaaggc cactactgact gctgacaaat cctccaacac agcctacatg      300
caactcacca gcctgacctc tgtggactct gcggtctatt tatgtgcaag aaatgtcttt      360
gatggttact ggttagttta ctggggccaa gggactctgg tcaactgtctc tgcagctagc      420
accaagggcc catcggtctt ccccttgga ccctcctcca agagcacctc tgggggcaca      480
gcggccctgg gctgcctggg caaggactac ttccccgaac cggtgacggg gtcgtggaac      540
tcaggcgccc tgaccagcgg cgtgcacacc ttcccggtg tctacagtc ctcaggactc      600
tactccctca gcagcgtggg gaccgtgccc tccagcagct tgggcaccca gacctacatc      660
tgcaacgtga atcacaagcc cagcaacacc aagggtggaca agaaagcaga gcccaaactc      720
tgtgacaaaa ctcacacatg cccaccgtgc ccagcacctg aactcctggg gggaccgtca      780
gtcttcctct tcccccaaa acccaaggac accctcatga tctcccgga cctgaggtc      840
acatgcgtgg tgggtggacgt gagccacgaa gacctgagg tcaagttcaa ctggtacgtg      900
gacggcgtgg aggtgcataa tgccaagaca aagccgcggg aggagcagta caacagcacg      960
taccgtgtgg tcagcgtcct caccgtcctg caccaggact ggctgaatgg caaggagtac     1020
aagtgcaagg tctccaacaa agccctccca gccccatcg agaaaaccat ctccaaagcc     1080
aaagggcagc cccgagaacc acaggtgtac accctgcccc catcccgga tgagctgacc     1140
aagaaccagg tcagcctgac ctgcctgggc aaaggcttct atcccagcga catcgccgtg     1200
gagtggggaga gcaatgggca gccggagaa aactacaaga ccacgcctcc cgtgctggac     1260
tccgacggct ccttcttcct ctacagcaag ctcaccgtgg acaagagcag gtggcagcag     1320
gggaacgtct tctcatgctc cgtgatgcat gaggtctctg acaaccacta cacgcagaag     1380
agcctctccc tgtctccggg taaatga                                           1407

```

<210> 12

<211> 720

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> cADN ghép chuột-người

<400> 12

```

atggattttc aggtgcagat tatcagcttc ctgctaataca gtgcttcagt cataatgtcc      60
agaggagaca ttgtgctcac ccaaactaca aatccagtca ctcttggaac atcagcttcc      120
atctcctgca ggtctagtaa gagtctocta catagtaatg gcatcaacta tttgtattgg      180
tatctgcaga agccaggcca gtctcctcag ctcttgattt atcagatgtc caaccttgtc      240
tcaggagtcc cagacaggtt cagtagcagt gggtcaggaa ctgatttcac actgagaatc      300
agcagagtgg aggctgagga tgtgggtggt tattactgtg ctcaaaatct agaacttccg      360
tacacgttcg gagggggggac caagctggaa ataaaacgta cggtggtgctgc accatctgtc      420
ttcatcttcc cgccatctga tgagcagttg aaatctggaa ctgcctctgt tgtgtgcctg      480
ctgaataact tctatcccag agaggccaaa gtacagtgga aggtggataa cgccctccaa      540
tcgggtaact ccaggagag tgtcacagag caggacagca aggacagcac ctacagcctc      600
agcagcaccg tgacgctgag caaagcagac tacgagaaac acaaagtcta cgctgcgaa      660
gtcaccatc agggcctgag ctgcctcgtc acaaagagct tcaacagggg agagtgttag      720

```

<210> 13

<211> 468

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 13

```

Met Gly Trp Ser Leu Ile Leu Leu Phe Leu Val Ala Val Ala Thr Arg
1           5           10          15

```

```

Val Leu Ser Glu Val Lys Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Lys
20          25          30

```

```

Pro Gly Ala Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Ala Phe
35          40          45

```

```

Ser Tyr Ser Trp Met Asn Trp Val Lys Leu Arg Pro Gly Gln Gly Leu
50          55          60

```

```

Glu Trp Ile Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn
65          70          75          80

```

```

Gly Lys Phe Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Asn
85          90          95

```

Thr Ala Tyr Met Gln Leu Thr Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val
100 105 110

Tyr Leu Cys Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp
115 120 125

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala Ala Ser Thr Lys Gly Pro
130 135 140

Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr
145 150 155 160

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
165 170 175

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro
180 185 190

Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr
195 200 205

Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn
210 215 220

His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Ala Glu Pro Lys Ser
225 230 235 240

Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu
245 250 255

Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu
260 265 270

Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser
275 280 285

His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu
290 295 300

Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr
305 310 315 320

Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
325 330 335

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro
340 345 350

Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln
355 360 365

Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val
370 375 380

Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val
385 390 395 400

Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
405 410 415

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr
420 425 430

Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val
435 440 445

Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu
450 455 460

Ser Pro Gly Lys
465

<210> 14
<211> 239
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 14

Met Asp Phe Gln Val Gln Ile Ile Ser Phe Leu Leu Ile Ser Ala Ser
1 5 10 15

Val Ile Met Ser Arg Gly Asp Ile Val Leu Thr Gln Thr Thr Asn Pro
20 25 30

Val Thr Leu Gly Thr Ser Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Lys Ser
35 40 45

Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys
50 55 60

Pro Gly Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val
65 70 75 80

Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Ser Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
85 90 95

Thr Leu Arg Ile Ser Arg Val Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr
100 105 110

Cys Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys
115 120 125

Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro
130 135 140

Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu
145 150 155 160

Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp
165 170 175

Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp
180 185 190

Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
195 200 205

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln
210 215 220

Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
225 230 235

<210> 15

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 15

Tyr Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 16

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 16

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr
1 5

<210> 17

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 17

Gly Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser Trp Met Asn
1 5 10

<210> 18

<211> 16

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 18

Arg Ser Ser Lys Ser Leu Leu His Ser Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr
1 5 10 15

<210> 19

<211> 7

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 19

Gln Met Ser Asn Leu Val Ser
1 5

<210> 20

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 20

Ala Gln Asn Leu Glu Leu Pro Tyr Thr
1 5

<210> 21

<211> 51

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 21

cggatttttc ctggagatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg c

51

<210> 22

<211> 24
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 22
 tttcctggag atggggatac tgac 24

<210> 23
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 23
 cggatttttc ctggagatgg ggatactgac 30

<210> 24
 <211> 30
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 24
 aatgtctttg atggttactg gttagtttac 30

<210> 25
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 25

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 26
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 26

Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
 1 5

<210> 27
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 27

Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp
 1 5 10

<210> 28
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 28

Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr
 1 5 10

<210> 29
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> ADN ghép chuột-người

<400> 29
 caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttccggata caccttcagc tattcttggga tgagctgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatggtt actggcttgt ttactggggc caggggaacc tggtcacctg ctctctca 357

<210> 30
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 30

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 Tyr Thr Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 31
<211> 357
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> ADN ghép chuột-người

<400> 31
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagt gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 32
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 32

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 Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe

50

55

60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 33
<211> 366
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> ADN ghép chuột-người

<400> 33
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttggg tgaactgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt atctgtgtgc aagaaatgtc 300
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctcagct 360
agcacc 366

<210> 34
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 34

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 Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 35
<211> 357
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> ADN ghép chuột-người

<400> 35
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggagcttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg tctccggata cgcgttcagc tattcttggga tgaactgggt gcggcaggcc 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 36
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 36

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

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

20

25

30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 37

<211> 357

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> ADN ghép chuột-người

<400> 37

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg ctcccgata cgcgttcagc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcg 120
 cctggacaag ggctcgagt gatgggacg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggt actggcttgt ttactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctcctca 357

<210> 38

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 38

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 Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 39

<211> 357

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> ADN ghép chuột-người

<400> 39

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata. cgccttcagc tattcttgga tcaattgggt gcggcaggcg 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 40

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 40

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 Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 41
<211> 357
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> ADN ghép chuột-người

<400> 41
caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctgggagttc agtgaaggtc 60
tcctgcaagg cttccggata cgccttcagc tattcttgga tctcgtgggt gcggcaggcg 120
cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc ttggtaccgt ctctca 357

<210> 42
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 42

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 Tyr Ala Phe Ser Tyr Ser
20 25 30

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 43

<211> 357

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> ADN ghép chuột-người

<400> 43

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgccctc agtgaagggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcaca tacagctgga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 44

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 44

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 45

<211> 357

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> ADN ghép chuột-người

<400> 45

caggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggcgccctc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcagc tattcttggga tgaactgggt gcggcaggcc 120

cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240

atgggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatggtt actggcttgt ttactggggc caggggaacc tggtcaccgt ctccctca 357

<210> 46
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 46

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> ADN ghép chuột-người

<400> 47

cagggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggcctc agtgaaggtc 60
 tcctgcaagg cttccggata caccttcacc tattcttggga tgcactgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatg acacgggaca cgtccacttc caccgtctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300

tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctca 357

<210> 48
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 48

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

Gln Gly Arg Val Thr Met Thr Arg Asp Thr Ser Thr Ser Thr Val 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 Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 49
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> ADN ghép chuột-người

<400> 49

gaggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttgga tgcactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180

gcagagaaat tccaaggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240

atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300

tttcatgggtt actggcttgt ttactggggc caggaaccc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 50

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 50

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
20 25 30

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

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

Gln Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 51

<211> 357

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> ADN ghép chuột-người

<400> 51

gaggtgcaat tgggtgcagtc tggcgctgaa gtaagaagc ctggggccac cgtgaagatc 60

tcctgcaagg tgtccggata caccttcacc tattcttggga tgaactgggt gcagcaggcc 120

cctggaaagg ggctcgagtg gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggaag agtcacaatc acagccgaca cgtccactga caccgcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aaccaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 52
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 52

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

Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Val Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Tyr Ser
20 25 30

Trp Met Asn Trp Val Gln Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Met
35 40 45

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Asp 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 Thr Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 53
<211> 366
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> ADN ghép chuột-người

<400> 53

cagatgcaat tggtgcagtc tggcgctgaa gttaagaaga ccgggagttc agtgaaggtc 60

tcctgcaagg cttccggata caccttcacc tattcttgga tgagctgggt gcggcaggcc 120
 cctggacaag ggctcgagt gatgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
 gcacagaaat tccaaggaag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
 atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
 tttgatgggt actggcttgt ttactggggc cagggaaccc tggtcaccgt ctctcagct 360
 agcacc 366

<210> 54
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 54

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 55
 <211> 357
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>

<223> ADN ghép chuột-người

<400> 55

```

gaagtgcagc tggaggagtc tggaggagtc ttgggtcaagc ctggcgggctc cctgcggctc      60
tcctgtgcag cctctggatt cacatttagc tattcttgga tgaactgggt gcggcaggct      120
cctggaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac      180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat      240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc      300
tttgatggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc ttgtcaccgt ctctca      357

```

<210> 56

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 56

```

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

```

```

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

```

```

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

```

```

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
          50           55           60

```

```

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65           70           75           80

```

```

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

```

```

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

```

```

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
          115

```

<210> 57

<211> 456

<212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> ADN ghép chuột-người

<400> 57
 cggaattcgg cccaccgggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
 agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgtg cagcctctgg attcgcatc agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
 ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
 acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
 ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 58
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 58
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Ala Phe Ser Tyr Ser
 20 25 30
 Trp Met Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60
 Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80
 Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly
 100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 357
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> ADN ghép chuột-người

<400> 59
caggtgcagc tgggtggagtc tggaggaggc ttgggtcaagc ctggcggggc cctgcgggctc 60
tcctgtgcag cctctgggatt cacatttagc tattcttggga tgaactgggt gcggcaggct 120
cctggaaaagg gcctcgagtg ggtgggacgg atctttcccg gcgatgggga tactgactac 180
aatgggaaat tcaagggcag agtcacaatt accgccgaca aatccactag cacagcctat 240
atggagctga gcagcctgag atctgaggac acggccgtgt attactgtgc aagaaatgtc 300
tttgatgggtt actggcttgt ttactggggc cagggaaacc tggtcaccgt ctctctca 357

<210> 60
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 60

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 61
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> ADN ghép chuột-người

<400> 61
 cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtgga gtctggagca ggcttggtca 120
 agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgcggcag gtccttggaagg agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
 ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
 acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
 ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 62
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 62

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

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

65

70

75

80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 63
<211> 456
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> ADN ghép chuột-người

<400> 63
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctcgtcga gtctggagga ggcgtggtca 120
agcctggcgg gtccttgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gtccttggaaggggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 64
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 64

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 65
<211> 456
<212> ADN
<213> Nhân tạo

<220>
<223> ADN ghép chuột-người

<400> 65
cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagctcac tccgaagtgc agctggtcga gtccggagga ggcttgaaga 120
agcctggcgg gtccttgagg ctctcctgag cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gtccttgaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 66
<211> 119
<212> PRT
<213> Nhân tạo

<220>
<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 66

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 67

<211> 456

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> ADN ghép chuột-người

<400> 67

cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60

cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120

agcctggctc ttccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180

ggatgaactg ggtgcggcag gctcctggaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240

ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggc cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360

tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420

ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 68

<211> 119

<212> PRT

<213> Nhân tạo

<220>

<223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 68

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 69

<211> 456

<212> ADN

<213> Nhân tạo

<220>

<223> ADN ghép chuột-người

<400> 69

cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
cagcagccac aggagccac tccgaagtgc agctgggtga gtctggagga ggcttggtca 120
agcctggcgg gtccctgcgg gtcagctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
ggatgaactg ggtgcggcag gtccttgaa agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300
acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
ccctggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 70
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 70

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 71
 <211> 456
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> ADN ghép chuột-người

<400> 71

cggaattcgg cccaccggtg gccaccatgg actggacctg gaggatcctc ttcttggtgg 60
 cagcagccac aggagcccac tccgaagtgc agctgggtgga gtctggagga ggcttggtca 120
 agcctggcgg gtccctgcgg ctctcctgcg cagcctctgg attcacattt agctattctt 180
 ggatgaactg ggtgcggcag gtccttgga agggcctcga gtgggtggga cggatctttc 240
 ccggcgatgg ggatactgac tacaatggga aattcaaggg cagagtcaca attaccgccg 300

acaaatccac tagcacagcc tatatggagc tgagcagcct gagatctgag gacacggccg 360
 tgtattactg tgcaagaaat gtctttgatg gttactggct tgtttactgg ggccagggaa 420
 ccctgggtcac cgtctcctca gctagcgaat tctcga 456

<210> 72
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 72

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

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

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

Gly Arg Ile Phe Pro Gly Asp Gly Asp Thr Asp Tyr Asn Gly Lys Phe
 50 55 60

Lys Gly Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser Thr Ala Tyr
 65 70 75 80

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73
 <211> 57
 <212> ADN
 <213> Homo sapiens

<400> 73

atggactgga cctggaggat cctcttcttg gtggcagcag ccacaggagc ccaactcc 57

<210> 74
 <211> 19

<212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 74

Met Asp Trp Thr Trp Arg Ile Leu Phe Leu Val Ala Ala Ala Thr Gly
 1 5 10 15

Ala His Ser

<210> 75
 <211> 345
 <212> ADN
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> ADN ghép chuột-người

<400> 75
 gatatcgtga tgaccagac tccactctcc ctgcccgta cccttgaga gcccgccagc 60
 attagctgca ggtctagcaa gagcctcttg cacagcaatg gcatactta ttgtattgg 120
 tacctgcaaa agccagggca gtctccacag ctctgattt atcaaagtgc caaccttgtc 180
 tctggcgtcc ctgaccggtt ctccggatcc gggtcaggca ctgatttcac actgaaaatc 240
 agcaggggtgg aggctgagga tgttggagtt tattactgcg ctcagaatct agaacttcct 300
 tacaccttcg gcggagggac caaggtggag atcaaacgta cggtg 345

<210> 76
 <211> 115
 <212> PRT
 <213> Nhân tạo

<220>
 <223> Polypeptit ghép chuột-người

<400> 76

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val 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 Ala Gln Asn
85 90 95

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

Arg Thr Val
115

<210> 77

<211> 66

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 77

atggacatga gggccccgc tcagctcctg ggctcctgc tgctctgggtt cccaggtgcc 60

aggtgt 66

<210> 78

<211> 22

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 78

Met Asp Met Arg Val Pro Ala Gln Leu Leu Gly Leu Leu Leu Leu Trp
1 5 10 15

Phe Pro Gly Ala Arg Cys
20