



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

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

(11)



1-0030003

(51)<sup>7</sup> A61K 39/00; C07K 16/00

(13) B

(21) 1-2012-02609

(22) 01/03/2011

(86) PCT/US2011/026689 01/03/2011

(87) WO 2011/109400 09/09/2011

(30) 61/310,692 04/03/2010 US; 61/310,695 04/03/2010 US; 61/311,057 05/03/2010 US

(45) 25/11/2021 404

(43) 25/04/2013 301A

(73) MACROGENICS, INC. (US)

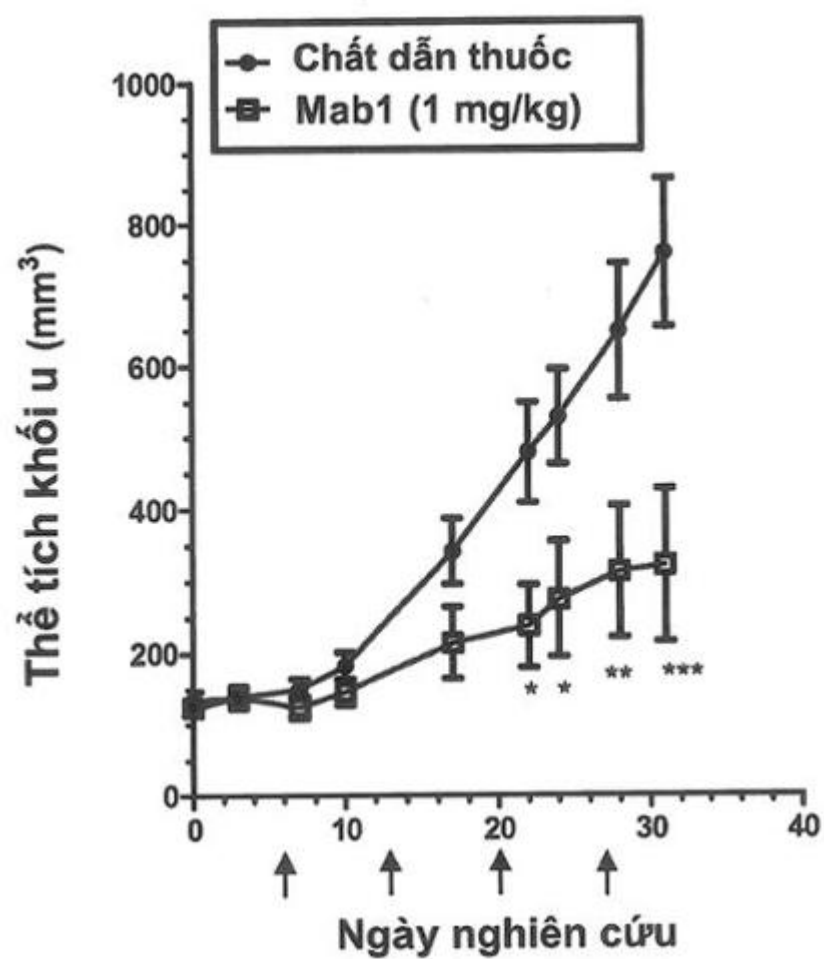
9640 Medical Center Drive, Rockville, MD 20850, United States of America

(72) LOO, Deryk, T. (CA); HUANG, Ling (US); MOORE, Paul, A. (GB); CHEN, Francine, Zhifen (US); JOHNSON, Leslie, S. (US).

(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) PHÂN TỬ LIÊN KẾT B7-H3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ LIÊN KẾT B7-H3 NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến phân tử liên kết B7-H3 là kháng thể và mảnh kháng thể mà phản ứng miễn dịch với thụ thể B7-H3 của động vật có vú, và cụ thể hơn là thụ thể B7-H3 của người để sử dụng trong điều trị bệnh ung thư và chứng viêm. Do đó, sáng chế đề cập cụ thể đến kháng thể có phản ứng với B7-H3 được biến đổi giống như của người và mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể này mà có khả năng điều tiết, và tốt hơn nữa nếu tăng cường quá trình hoạt hoá hệ miễn dịch nhằm kháng tế bào ung thư có liên quan đến nhiều bệnh ung thư khác nhau ở người. Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm chứa phân tử liên kết B7-H3 này.



### **Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập**

Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh kháng thể mà phản ứng miễn dịch với thụ thể B7-H3 của động vật có vú, và cụ thể hơn là thụ thể B7-H3 của người và việc sử dụng chúng, cụ thể là trong điều trị bệnh ung thư và chứng viêm. Do đó, sáng chế đề cập cụ thể kháng thể có phản ứng với B7-H3 được biến đổi giống như của người và mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể này mà có khả năng điều tiết, và tốt hơn nữa nếu tăng cường quá trình hoạt hoá hệ miễn dịch nhằm kháng tế bào ung thư có liên quan đến nhiều bệnh ung thư khác nhau ở người.

### **Tình trạng kỹ thuật của sáng chế**

Sự phát triển và di căn của khối u phụ thuộc nhiều vào khả năng của khối u trong việc lẩn tránh sự giám sát miễn dịch của vật chủ và vượt qua lớp phòng thủ của vật chủ. Hầu hết các khối u biểu hiện kháng nguyên có thể được nhận biết ở các mức độ khác nhau bởi hệ miễn dịch của vật chủ, nhưng trong nhiều trường hợp xảy ra đáp ứng miễn dịch không đầy đủ do quá trình hoạt hoá tế bào T tác động không hiệu quả (Khawli, L.A. et al. (2008) “Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors”, *Exper. Pharmacol.* 181:291-328).

Lympho bào T CD4<sup>+</sup> là yếu tố cấu tạo quan trọng trong hầu hết các đáp ứng miễn dịch và tự miễn ở động vật có vú (Dong, C. et al. (2003) “Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules”, *Immunolog. Res.* 28(1):39-48). Quá trình hoạt hoá tế bào T hỗ trợ CD4<sup>+</sup> đã được phát hiện là được điều tiết qua tương tác kích thích đồng thời giữa tế bào trình diện kháng nguyên và lympho bào T CD4<sup>+</sup> non. Hai tương tác là bắt buộc (Viglietta, V. et al. et al. (2007) “Modulating Co-Stimulation”, *Neurotherapeutics* 4:666-675; Korman, A.J. et al. (2007) “Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy”, *Adv. Immunol.* 90:297-339). Trong tương tác thứ nhất, tế bào trình diện kháng nguyên phải biểu lộ kháng nguyên đích liên quan được liên kết với phức hợp tương thích mô chính của tế bào sao cho nó có thể liên kết với thụ thể tế bào T (“TCR”) của lympho bào T CD4<sup>+</sup> non. Trong tương tác thứ hai, phối tử của tế bào

trình diện kháng nguyên phải liên kết với thụ thể CD28 của lymphô bào T CD4<sup>+</sup> (Dong, C. et al. (2003) “Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules”, *Immunolog. Res.* 28(1):39-48; Lindley, P.S. et al. (2009) “The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Costimulation”, *Immunol. Rev.* 229:307-321). Tế bào T hỗ trợ CD4<sup>+</sup> nhận biết được cả hai tín hiệu kích thích sau đó có khả năng đáp ứng với xytokin (như Interleukin-2 và Interleukin-12 để phát triển thành tế bào Th1. Tế bào này tạo ra interferon-gama (IFN- $\gamma$ ) và yếu tố gây hoại tử khối u alpha (TNF- $\alpha$ ), điều tiết các đáp ứng viêm với tế bào đích biểu hiện kháng nguyên đích. Quá trình hoạt hoá và tăng sinh tế bào B cũng xảy ra, dẫn đến việc tạo ra kháng thể đặc hiệu đối với kháng nguyên đích (BeARNrd, A. et al. (2005) “T and B Cell Cooperation: A Dance of Life and Death”, *Transplantation* 79:S8-S11). Khi không có cả hai tín hiệu kích thích đồng thời trong quá trình gắn TCR, tế bào T tiến vào trạng thái không đáp ứng chức năng, được gọi là tính không dị ứng vô tính (Khawli, L.A. et al. (2008) “Cytokine, Chemokine, and Co-Stimulatory Fusion Proteins for the Immunotherapy of Solid Tumors”, *Exper. Pharmacol.* 181:291-328). Theo các tình trạng bệnh lý, tế bào Th1 là nhân tố quan trọng ở nhiều bệnh tự miễn đặc hiệu đối với cơ quan khác nhau, như bệnh đái tháo đường typ I, viêm đa khớp dạng thấp và bệnh đa xơ cứng (Dong, C. et al. (2003) “Immune Regulation by Novel Costimulatory Molecules”, *Immunolog. Res.* 28(1):39-48).

### I. Họ chung B7 và B7-H3

Việc nghiên cứu về phối tử của thụ thể CD28 đã dẫn đến việc mô tả đặc điểm nhóm các phân tử liên quan đã được biết đến là họ chung B7 (Coyle, A.J. et al. (2001) “The Expanding B7 Superfamily: Increasing Complexity In Costimulatory Signals Regulating T Cell Function”, *Nature Immunol.* 2(3):203-209; Sharpe, A.H. et al. (2002) “The B7-CD28 Superfamily”, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126; Greenwald, R.J. et al. (2005) “The B7 Family Revisited”, *Ann. Rev. Immunol.* 23:515-548; Collins, M. et al. (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands”, *Genome Biol.* 6:223.1-223.7; Loke, P. et al. (2004) “Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells.” *Arthritis Res. Ther.* 6:208-214; Korman, A.J. et al. (2007) “Checkpoint Blockade in Cancer Immunotherapy”, *Adv. Immunol.* 90:297-339; Flies, D.B. et al. (2007) “The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor



Immunity”, *J. Immunother.* 30(3):251-260; Agarwal, A. et al. (2008) “The Role Of Positive Costimulatory Molecules In Transplantation And Tolerance”, *Curr. Opin. Organ Transplant.* 13:366-372; Lenschow, D.J. et al. (1996) “CD28/B7 System of T Cell Costimulation”, *Ann. Rev. Immunol.* 14:233-258; Wang, S. et al. (2004) “Co-Signaling Molecules Of The B7-CD28 Family In Positive And Negative Regulation Of T Lymphocyte Responses”, *Microbes Infect.* 6:759-766). Hiện nay có bảy thành viên thuộc họ này: B7.1 (CD80), B7.2 (CD86), phối tử kích thích đồng thời cảm ứng được (ICOS-L), phối tử gây chết theo chương trình 1 (PD-L1), phối tử gây chết theo chương trình 2 (PD-L2), B7-H3 và B7-H4 (Collins, M. et al. (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands”, *Genome Biol.* 6:223.1-223.7).

Các thành viên thuộc họ B7 là các thành viên thuộc họ chung với miền giống globulin miễn dịch V và globulin miễn dịch C (ví dụ, IgV-IgC) (Sharpe, A.H. et al. (2002) “The B7-CD28 Superfamily”, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126). Mỗi miền IgV và IgC của các thành viên thuộc họ B7 được mã hoá bởi một exon, với các exon bổ sung mã hoá trình tự dẫn đầu, miền xuyên màng và thuộc chất tế bào. Miền thuộc chất tế bào này ngắn, có độ dài từ 19 đến 62 gốc axit amin và có thể được mã hoá bởi nhiều exon (Collins, M. et al. (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands”, *Genome Biol.* 6:223.1-223.7). B7-H3 đặc trưng ở chỗ dạng chính ở người chứa hai miền IgV-IgC nối tiếp ngoại bào (tức là IgV-IgC-IgV-IgC) (Collins, M. et al. (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands”, *Genome Biol.* 6:223.1-223.7). Các thành viên của họ B7 được dự đoán sẽ tạo ra dime cùng loại liên tiếp, không cộng hoá trị ở bề mặt tế bào, và dime này đã được phát hiện theo B7-1 (CD80) và B7-2 (CD86).

B7-1 (CD80) và B7-2 (CD86) có tính đặc hiệu kép đối với thụ thể CD28 kích thích và thụ thể CTLA-4 (CD152) ức chế (Sharpe, A.H. et al. (2002) “The B7-CD28 Superfamily”, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126).

Mặc dù ban đầu cho rằng chỉ có 2 miền Ig (IgV-IgC) (Chapoval, A. et al. (2001) “B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- $\gamma$  Production”, *Nature Immunol.* 2:269-274; Sun, M. et al. (2002) “Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes”, *J. Immunol.* 168:6294-6297), biến thể của miền ngoại bào chứa bốn globulin miễn dịch (“4Ig-B7-H3”) đã được nhận dạng và được phát hiện là dạng

protein ở người phổ biến (Sharpe, A.H. et al. (2002) “The B7-CD28 Superfamily”, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126). Không có sự khác biệt về mặt chức năng giữa hai dạng này, do dạng chuột tự nhiên (2Ig) và dạng 4Ig của người biểu hiện chức năng tương tự nhau (Hofmeyer, K. et al. (2008) “The Contrasting Role Of B7-H3”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30):10277-10278). Phân tử 4Ig-B7-H3 ức chế quá trình ly giải tế bào ung thư qua trung gian tế bào diệt tự nhiên (Castriconi, R. “Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(34): 12640-12645). B7-H3 của người (dạng 2Ig) đã được phát hiện là thúc đẩy quá trình hoạt hoá tế bào T và tạo ra IFN- $\gamma$  bằng cách liên kết với thụ thể giả định trên tế bào T đã hoạt hoá (Chapoval, A. et al. (2001) “B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- $\gamma$  Production”, *Nature Immunol.* 2:269–274; Xu, H. et al. (2009) “MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors”, *Cancer Res.* 69(15):5275-6281). Cả B7-H4 và B7-H1 đều là chất ức chế hiệu nghiệm có chức năng miễn dịch khi được biểu hiện trên tế bào u (Flies, D.B. et al. (2007) “The New B7s: Playing a Pivotal Role in Tumor Immunity”, *J. Immunother.* 30(3):251-260).

Cơ chế hoạt động của B7-H3 là ở dạng phức hợp do protein điều tiết cả quá trình kích thích đồng thời và quá trình ức chế đồng thời tế bào T (Hofmeyer, K. et al. (2008) “The Contrasting Role Of B7-H3”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30):10277-10278; Martin-Orozco, N. et al. (2007) “Inhibitory Costimulation And Anti-Tumor Immunity”, *Semin. Cancer Biol.* 17(4):288-298; Subudhi, S.K. et al. (2005) “The Balance Of Immune Responses: Costimulation Verse Coinhibition”, *J. Mol. Med.* 83:193-202). B7-H3 không những liên kết với sản phẩm phiên mã giống (TREM) 2 (TLT-2) và kích thích đồng thời quá trình hoạt hoá tế bào T, mà còn liên kết với (các) thụ thể chưa được nhận dạng để điều tiết quá trình ức chế đồng thời tế bào T. Ngoài ra, qua tương tác với (các) thụ thể chưa biết, B7-H3 là chất ức chế của tế bào diệt tự nhiên và tế bào nguyên bào xương (Hofmeyer, K. (2008) “The Contrasting Role Of B7-H3”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30):10277-10278). Quá trình ức chế có thể thực hiện qua tương tác với thành viên của con đường truyền tín hiệu chính mà qua đó thụ thể tế bào T (TCR) điều hoà quá trình phiên mã gen (ví dụ, các yếu tố NF- $\kappa$ B, NF- $\kappa$ B).

hoặc AP-1).

B7-H3 kích thích đồng thời quá trình tăng sinh tế bào T CD4<sup>+</sup> và CD8<sup>+</sup>. B7-H3 cũng kích thích quá trình tạo ra IFN- $\gamma$  và hoạt tính ly giải CD8<sup>+</sup> (Chapoval, A. et al. (2001) “B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- $\gamma$  Production”, *Nature Immunol.* 2:269–274; Sharpe, A.H. et al. (2002) “The B7-CD28 Superfamily”, *Nature Rev. Immunol.* 2:116-126). Tuy nhiên, protein này cũng có khả năng hoạt động qua các yếu tố NFAT (yếu tố nhân cho tế bào T đã hoạt hoá), NF- $\kappa$ B (yếu tố nhân kapa B), và AP-1 (protein hoạt hoá 1) để ức chế quá trình hoạt hoá tế bào T (Yi. K.H. et al. (2009) “Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4”, *Immunol. Rev.* 229:145-151). B7-H3 is also believed to inhibit Th1, Th2, or Th17 in vivo (Prasad, D.V. et al. (2004) “Murine B7–H3 Is A Negative Regulator Of T Cells”, *J. Immunol.* 173:2500-2506; Fukushima, A. et al. (2007) “B7–H3 Regulates The Development Of Experimental Allergic Conjunctivitis In Mice”, *Immunol. Lett.* 113:52-57; Yi. K.H. et al. (2009) “Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4”, *Immunol. Rev.* 229:145-151). Các nghiên cứu độc lập đã cho thấy tế bào u ác tính ở người thể hiện sự gia tăng rõ rệt về sự biểu hiện protein B7-H3 và sự biểu hiện gia tăng này có liên quan đến mức trầm trọng của bệnh tăng lên (Zang, X. (2007) “The B7 Family And Cancer Therapy: Costimulation And Coinhibition”, *Clin. Cancer Res.* 13:5271-5279), đề xuất rằng B7-H3 được khối u lợi dụng làm con đường lẩn tránh miễn dịch (Hofmeyer, K. (2008) “The Contrasting Role Of B7-H3”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30):10277-10278).

Phân tử mà phong bế khả năng liên kết của phân tử B7 với thụ thể tế bào T (ví dụ, CD28) ức chế hệ miễn dịch và đã được đề xuất làm phương pháp điều trị bệnh tự miễn (Linsley, P.S. et al. (2009) “The Clinical Utility Of Inhibiting CD28-Mediated Co-Stimulation”, *Immunolog. Rev.* 229:307-321). Tế bào u nguyên bào thần kinh biểu hiện 4Ig-B7-H3 đã được xử lý với kháng thể kháng 4Ig-B7-H3 miễn cảm hơn với tế bào NK. Tuy nhiên, không rõ liệu hoạt tính này có thể là chỉ do kháng thể kháng dạng 4Ig-B7-H3 hay không vì tất cả các kháng thể đã báo cáo được làm kháng 4Ig-B7-H3 cũng liên kết với dạng giống hai Ig của B7H3 (Steinberger, P. et al. (2004) “Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like

Domains”, J. Immunol. 172(4): 2352-2359 và Castriconi et al. (2004) “Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34):12640-12645).

B7-H3 không được biểu hiện trên tế bào B hoặc tế bào T nghỉ, bạch cầu đơn nhân to hoặc tế bào đuôi gai, nhưng nó được cảm ứng trên tế bào đuôi gai bởi IFN- $\gamma$  và trên bạch cầu đơn nhân to bởi GM-CSF (Sharpe, A.H. et al. (2002) “The B7-CD28 Superfamily”, Nature Rev. Immunol. 2:116-126). (Các) thụ thể liên kết với B7-H3 không được mô tả đầy đủ. Nghiên cứu trước đây đã đề xuất rằng một thụ thể như vậy sẽ cần phải được điều hoà tăng nhanh và ngắn trên tế bào T sau khi hoạt hoá (Loke, P. et al. (2004) “Emerging Mechanisms Of Immune Regulation: The Extended B7 Family And Regulatory T Cells.” Arthritis Res. Ther. 6:208-214). Gần đây, thụ thể phiên mã giống (TREM) 2 (TLT-2 hoặc TREML2) (King, R.G. et al. (2006) “Trem-Like Transcript 2 Is Expressed On Cells Of The Myeloid/Granuloid And B Lymphoid Lineage And Is Up-Regulated In Response To Inflammation”, J. Immunol. 176:6012-6021; Klesney-Tait, J. et al. (2006) “The TREM Receptor Family And Signal Integration”, Nat. Immunol. 7:1266–1273; Yi. K.H. et al. (2009) “Fine Tuning The Immune Response Through B7-H3 And B7-H4”, Immunol. Rev. 229:145-151), được biểu hiện trên tủy bào đã được cho thấy là có khả năng liên kết với B7-H3, và nhờ đó kích thích đồng thời quá trình hoạt hoá tế bào T CD8<sup>+</sup> một cách cụ thể (Zang, X. et al. (2003) “B7x: A Widely Expressed B7 Family Member That Inhibits T Cell Activation”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 100:10388–10392; Hashiguchi, M. et al. (2008) “Triggering Receptor Expressed On Myeloid Cell-Like Transcript 2 (TLT-2) Is A Counter-Receptor For B7–H3 And Enhances T Cell Responses”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10495-10500; Hofmeyer, K. et al. (2008) “The Contrasting Role Of B7-H3”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 105(30):10277-10278).

Ngoài sự biểu hiện của nó trên tế bào u nguyên bào thần kinh, B7-H3 của người còn được biết là được biểu hiện trên nhiều tế bào ung thư khác nhau (ví dụ, ung thư dạ dày, ung thư buồng trứng và ung thư phổi tế bào không nhỏ). Sự biểu hiện protein B7-H3 đã được phát hiện theo cách mô miễn dịch ở dòng tế bào u (Chapoval, A. et al.

(2001) “B7-H3: A Costimulatory Molecule For T Cell Activation and IFN- $\gamma$  Production”, *Nature Immunol.* 2:269–274; Saatian, B. et al. (2004) “Expression Of Genes For B7-H3 And Other T Cell Ligands By Nasal Epithelial Cells During Differentiation And Activation”, *Amer. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.* 287:L217–L225; Castriconi et al. (2004) “Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 101(34):12640-12645; Sun, M. et al. (2002) “Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes”, *J. Immunol.* 168:6294-6297). Sự biểu hiện mRNA đã được phát hiện ở tế bào tim, thận, tinh hoàn, phổi, gan, tụy, tuyến tiền liệt, ruột kết và nguyên bào xương (Collins, M. et al. (2005) “The B7 Family Of Immune-Regulatory Ligands”, *Genome Biol.* 6:223.1-223.7). Ở mức độ protein, B7-H3 được tìm thấy ở gan, phổi, bàng quang, tinh hoàn, tuyến tiền liệt, vú, nhau thai và các cơ quan bạch huyết của người (Hofmeyer, K. et al. (2008) “The Contrasting Role Of B7-H3”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 105(30):10277-10278).

## II. Kháng thể trị liệu

Ngoài tác dụng đã biết của chúng trong chẩn đoán, kháng thể đã được cho thấy là hữu dụng dưới dạng chất trị liệu. Ví dụ, liệu pháp miễn dịch, hoặc việc sử dụng kháng thể cho mục đích trị liệu đã được sử dụng trong những năm gần đây để điều trị bệnh ung thư. Liệu pháp miễn dịch thụ động bao gồm việc sử dụng kháng thể đơn dòng trong điều trị bệnh ung thư (ví dụ, xem tài liệu DeVITA, HELLMAN, VÀ ROSENBERG'S CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, EIGHTH EDITION (2008), DeVita, V. et al. Eds., Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA, pp. 537-547, 2979-2990). Kháng thể này có thể có hoạt tính sinh học trị liệu cố hữu nhờ cả sự ức chế trực tiếp quá trình phát triển hoặc sống sót của tế bào u và khả năng của kháng thể này trong việc thu được hoạt tính tiêu diệt tế bào tự nhiên của hệ miễn dịch của cơ thể. Các chất này có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với chất phóng xạ hoặc hoá trị. Rituximab và Trastuzumab, được phê duyệt để điều trị u bạch huyết không phải dạng Hodgkin và ung thư vú, lần lượt là ví dụ về các chất trị liệu này. Theo cách khác, kháng thể có thể được sử dụng để tạo ra thể tiếp hợp kháng thể trong đó kháng thể được liên kết với chất độc và định hướng chất này đến khối u bằng cách liên kết đặc hiệu với khối u này. Gemtuzumab

ozogamicin là ví dụ về thể tiếp hợp kháng thể đã phê duyệt được sử dụng để điều trị bệnh bạch cầu.

Kháng thể đơn dòng mà liên kết với tế bào ung thư và có phương pháp sử dụng tiềm năng trong chẩn đoán và trị liệu đã được bộc lộ (ví dụ, xem các đơn yêu cầu cấp patent sau đây, không kể trường hợp khác, bộc lộ một số phân tử khối của các protein đích: Patent Mỹ số 6,054,561 (c-erbB-2 (Her2) có kích thước 200 kD và các kháng nguyên chưa biết khác có kích thước từ 40 đến 200 KD) và Patent Mỹ số 5,656,444 (protein bào thai ung thư có kích thước 50 kD và 55 kD)). Ví dụ về kháng thể trong các thử nghiệm lâm sàng và/hoặc được phê duyệt để điều trị khối u rắn bao gồm: Trastuzumab (kháng nguyên: 180 kD, HER2/neu), Edrecolomab (kháng nguyên: 40-50 kD, Ep-CAM), kháng thể kháng tiểu cầu chất béo trong sữa người (HMFG1) (kháng nguyên > 200 kD, HMW Mucin), Cetuximab (kháng nguyên: 150kD và 170kD, thụ thể EGF), Alemtuzumab (kháng nguyên: 21-28 kD, CD52), và Rituximab (kháng nguyên: 35 kD, CD20).

Kháng nguyên đích của trastuzumab (thụ thể Her-2) được sử dụng để điều trị bệnh ung thư vú và cetuximab (thụ thể EGF) trong thử nghiệm lâm sàng để điều trị các bệnh ung thư có mặt với mức phát hiện được nào đó ở số lượng lớn mô của người trưởng thành bình thường bao gồm da, ruột kết, phổi, buồng trứng, gan và tụy. Biên độ an toàn trong quá trình sử dụng các chất trị liệu này có thể được đưa ra nhờ chênh lệch về mức độ biểu hiện kháng nguyên hoặc về sự tiếp cận hoặc hoạt tính của kháng thể tại các vị trí này.

Một loại liệu pháp miễn dịch khác là liệu pháp miễn dịch chủ động, hoặc dùng vaccin, với kháng nguyên xuất hiện ở (các) bệnh ung thư cụ thể hoặc cấu trúc ADN mà điều khiển quá trình biểu hiện kháng nguyên, mà sau đó gây ra đáp ứng miễn dịch ở cá thể, tức là khiến cho cá thể này chủ động tạo ra kháng thể chống ung thư của chính mình. Miễn dịch chủ động không được sử dụng một cách thường xuyên như liệu pháp miễn dịch thụ động hoặc độc tố miễn dịch.

Các mô hình về tiến trình bệnh (bao gồm bệnh ung thư) được đề xuất. Lý thuyết bao gồm từ nguyên nhân bởi một biến cố lây nhiễm/biến nạp đến sự tiến triển của loại mô “giống bệnh” hoặc “giống bệnh ung thư” tăng dần cuối cùng là dẫn đến mô hình có

khả năng hoàn toàn gây bệnh hoặc ác tính. Một số người tranh luận rằng với bệnh ung thư, ví dụ, một biến cố đột biến là đủ để gây ác tính, trong khi những người khác tranh luận rằng các thay đổi tiếp đó cũng là cần thiết. Một số khác đề xuất rằng cần phải làm tăng tải trọng đột biến và phân hạng khối u cho quá trình khởi phát cũng như tiến trình của bệnh ung thư qua các biến cố chọn lọc đột biến liên tục ở mức độ tế bào. Một số đích ung thư chỉ được phát hiện ở mô u, trong khi các đích khác có mặt ở các mô thường và được điều hoà tăng và/hoặc được biểu hiện quá mức ở mô u. Trong những trường hợp này, một số nhà nghiên cứu đề xuất rằng sự biểu hiện quá mức có liên hệ với việc mắc phải bệnh ác tính, trong khi những người khác đề xuất rằng sự biểu hiện quá mức chỉ là đánh dấu xu hướng trên con đường dẫn đến tình trạng bệnh ngày càng gia tăng.

Trong một số trường hợp, đích ung thư, như các protein gây ung thư (oncoprotein) được biểu hiện hoặc được biểu hiện quá mức ở khối u, đã được cho thấy là có mặt trong quá trình phát triển phôi và bào thai và đóng vai trò làm chất điều hoà quá trình sinh trưởng và biệt hoá. Một số nhà nghiên cứu đã phát hiện ra rằng sự biểu hiện các protein gây ung thư này trong quá trình phát triển phôi thai và bào thai được xem là bị giới hạn ở các mô cụ thể và cũng bị giới hạn ở các giai đoạn cụ thể của quá trình phát triển. Trái lại, sự biểu hiện các protein gây ung thư này ở người trưởng thành đã được cho thấy là có liên quan đến sự biểu hiện quá mức trong quá trình phát triển khối u và/hoặc sự sai hỏng của các protein ức chế khối u.

Kháng thể chẩn đoán và/hoặc trị liệu lý tưởng sẽ là đặc hiệu đối với kháng nguyên có mặt ở số lượng lớn bệnh ung thư, nhưng không có hoặc chỉ có mặt ở mức thấp ở mô thường bất kỳ. Việc phát hiện, mô tả đặc điểm và phân lập kháng thể mới có khả năng liên kết với kháng nguyên mà liên quan đặc biệt đến (các) bệnh ung thư có thể hữu dụng theo nhiều cách. Trước tiên, kháng thể cần mang hoạt tính sinh học kháng tế bào ung thư này và có thể thu được đáp ứng miễn dịch để từ đó điều trị bệnh. Kháng thể này có thể được sử dụng làm chất trị liệu duy nhất hoặc kết hợp với các phương pháp điều trị hiện nay hoặc được sử dụng để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch được liên kết với chất độc. Kháng thể có cùng độ đặc hiệu nhưng không có hoặc có hoạt tính sinh học thấp khi được dùng riêng cũng có thể hữu dụng ở chỗ kháng thể có thể được sử dụng để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch với chất đồng vị phóng xạ, độc tố hoặc chất hoá trị hoặc liposom

chứa chất hoá trị, với dạng tiếp hợp này mang hoạt tính sinh học nhờ việc kháng thể định hướng độc tố đến tế bào chứa kháng nguyên.

Như nêu trên, kháng thể và các phân tử khác liên kết đặc hiệu với B7-H3 đã được mô tả (xem Patent Mỹ số 7,527,969; 7,368,554; 7,358,354; và 7,279,567; Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 20090087416; US 20090022747; US 20090018315; US2008116219; US20080081346; US 20050202536; US20030103963; US20020168762; Công bố đơn PCT số WO 2008/116219; WO 2006/016276; WO 2004/093894; WO 04/001381; WO 2002/32375; WO 2002/10187 và WO 2001/094413; EP 1292619B; Modak, S. et al. (March 1999) “Disialoganglioside GD2 And Antigen 8H9: Potential Targets For Antibody-Based Immunotherapy Against Desmoplastic Small Round Cell Tumor (DSRCT) And Rhabdomyosarcoma (RMS)”, Proceedings Of The American Association For Cancer Research Annual Meeting, Vol. 40:474 (90<sup>th</sup> Annual Meeting Of The American Association For Cancer Research; Philadelphia, Pennsylvania, US; April 10-14, 1999; Modak, S. et al. (March 2000) “Radioimmunotargeting To Human Rhabdomyosarcoma Using Monoclonal Antibody 8H9”, Proc. Am. Assoc. Cancer Res.41:724; Modak, S. et al. (2001) “Monoclonal Antibody 8H9 Targets A Novel Cell Surface Antigen Expressed By A Wide Spectrum Of Human Solid Tumors”, Cancer Res. 61(10):4048-4054; Steinberger, P. et al. (2004) “Molecular Characterization of Human 4Ig-B7-H3, a Member of the B7 Family with Four Ig-Like Domains”, J. Immunol. 172(4):2352-2359; Xu, H. et al. (2009) “MicroRNA miR-29 Modulates Expression of Immunoinhibitory Molecule B7-H3: Potential Implications for Immune Based Therapy of Human Solid Tumors”, Cancer Res. 69(15):5275-6281).

Tuy nhiên, một khía cạnh mong muốn về kháng thể chẩn đoán và/hoặc trị liệu lý tưởng sẽ là phát hiện và mô tả đặc điểm của kháng thể mới có khả năng điều tiết và đặc biệt là tăng cường quá trình hoạt hoá hệ miễn dịch kháng tế bào ung thư (đặc biệt là tế bào ung thư của người) mà liên quan đến nhiều bệnh ung thư. Các chế phẩm như vậy cũng hữu dụng trong việc phát triển thuốc (ví dụ, phân tử nhỏ) và còn mô tả đặc điểm của quá trình điều hoà, phát triển và quá trình biệt hoá tế bào.

Do đó, mặc dù có các ưu điểm trước đây, vẫn có nhu cầu về chế phẩm cải tiến



có khả năng liên kết với tế bào ung thư và tạo điều kiện thuận lợi hoặc điều tiết đáp ứng miễn dịch kháng tế bào ung thư. Các chế phẩm này có thể được sử dụng để chẩn đoán và điều trị bệnh ung thư. Dựa trên các phát hiện được bộc lộ ở đây, còn tồn tại nhu cầu về chế phẩm mới nhận dạng hai đích trên bề mặt tế bào một cách đặc hiệu và nhờ đó có thể điều biến, bằng cách làm giảm hoặc tăng cường, khả năng của B7-H3 trong việc điều tiết quá trình hoạt hoá tế bào T hoặc bằng cách nhận dạng và tiêu diệt tế bào ung thư mà biểu hiện B7-H3. Mục đích của sáng chế là xác định các chế phẩm này. Mục đích khác của sáng chế là đề xuất hợp chất mới để sử dụng trong thử nghiệm biểu hiện B7-H3.

Như được nêu chi tiết dưới đây, sáng chế đề cập đến kháng thể mới, cụ thể là bao gồm chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép (“DART™s”) bao gồm tác nhân điều biến quá trình hoạt hoá tế bào T B7-H3, mà có khả năng ảnh hưởng đến quá trình hoạt hoá tế bào T cũng như kháng thể mới liên kết với thụ thể B7-H3 của tế bào ung thư và tạo điều kiện thuận lợi hoặc điều tiết quá trình chết của tế bào. Sáng chế đề xuất chế phẩm này và việc sử dụng chúng trong chẩn đoán và điều trị bệnh như bệnh ung thư.

### **Bản chất kỹ thuật của sáng chế**

Sáng chế đề xuất kháng thể và mảnh kháng thể mà phản ứng miễn dịch với thụ thể B7-H3 của động vật có vú, và cụ thể hơn là thụ thể B7-H3 của người và việc sử dụng chúng, cụ thể là trong điều trị bệnh ung thư và chứng viêm. Do đó, sáng chế đề cập cụ thể kháng thể có phản ứng với B7-H3 được biến đổi giống như của người và mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể này mà có khả năng điều tiết, và tốt hơn nữa nếu tăng cường quá trình hoạt hoá hệ miễn dịch nhằm kháng tế bào ung thư có liên quan đến nhiều bệnh ung thư khác nhau ở người.

Cụ thể, sáng chế đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể, trong đó kháng thể được phân lập hoặc mảnh này chứa miền biến đổi liên kết đặc hiệu với miền ngoại bào của B7-H3, trong đó kháng thể này cạnh tranh để liên kết với B7-H3 với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể: BRCA69D, BRCA84D hoặc PRCA157.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể được phân lập nêu trên hoặc mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể, trong đó kháng thể hoặc mảnh này gồm miền biến đổi chứa:

(A) CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 21), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 23) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 25) của chuỗi nhẹ của BRCA69D và CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 29), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 31) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 33) của chuỗi nặng của BRCA69D;

(B) CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 5), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 9) của chuỗi nhẹ của BRCA84D và CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 13), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17) của chuỗi nặng của BRCA84D; hoặc

(C) CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 37), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 41) của chuỗi nhẹ của PRCA157 và CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 45), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 47) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 49) của chuỗi nặng của PRCA157.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể được phân lập hoặc mảnh phản ứng miễn dịch bất kỳ trong số các kháng thể được phân lập hoặc các mảnh kháng thể nêu trên, trong đó kháng thể này liên kết với B7-H3 được biểu hiện nội sinh trên bề mặt của tế bào ung thư.

Sáng chế còn đề xuất bất kỳ trong số các kháng thể được phân lập hoặc các mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể nêu trên, trong đó kháng thể này liên kết với B7-H3 mà được thu nhận khi liên kết với B7-H3 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào ung thư.

Sáng chế cũng đề xuất bất kỳ trong số các kháng thể được phân lập hoặc các mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể nêu trên, là kháng thể đơn dòng được biến đổi giống như của người.

Sáng chế còn đề xuất bất kỳ trong số các kháng thể được phân lập hoặc các mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể biến đổi chứa vùng IgG1 Fc biến thể của người, trong đó vùng IgG1 Fc biến thể của người này bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin so với vùng Fc của kháng thể gốc, biến đổi axit amin này bao gồm (các) biến đổi axit amin làm thay đổi ái lực hoặc tổng ái lực của vùng Fc biến thể để liên kết với FcγR sao cho kháng thể biến đổi biểu hiện chức năng tác động được cải thiện so với kháng thể gốc.

Sáng chế cũng đề xuất bất kỳ trong số các kháng thể được phân lập hoặc các mảnh kháng thể phản ứng miễn dịch của kháng thể nêu trên, trong đó biến đổi vùng Fc bao gồm:

(A) ít nhất một đột biến thể được chọn từ nhóm bao gồm:

- |            |               |
|------------|---------------|
| (1) F243L; | (5) Y300L;    |
| (2) D270E; | (6) V305I;    |
| (3) R292P; | (7) A330V; và |
| (4) S298N; | (8) P396L;    |

(B) ít nhất một đột biến thể hai gốc axit amin, đột biến thể này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) F243L và P396L;
- (2) F243L và R292P; và
- (3) R292P và V305I;

(C) ít nhất một đột biến thể ba gốc axit amin, đột biến thể này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) F243L, R292P và Y300L;
- (2) F243L, R292P và V305I;
- (3) F243L, R292P và P396L; và
- (4) R292P, V305I và P396L;

(D) ít nhất một đột biến thể bốn gốc axit amin, đột biến thể này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) F243L, R292P, Y300L và P396L; và
- (2) F243L, R292P, V305I và P396L;

hoặc

(E) đột biến thể ít nhất là năm gốc axit amin: F243L, R292P, Y300L, V305I và P396.

Sáng chế cũng đề xuất kháng thể nêu trên, trong đó kháng thể này bao gồm đột biến thể:

- (A) F243L, R292P và Y300L;

(B) L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L; hoặc

(C) F243L, R292P, Y300L, V305I và P396L.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể nêu trên, trong đó kháng thể này bao gồm:

(A) miền biến đổi chứa CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 5), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 9) của chuỗi nhẹ của BRCA84D và CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 13), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17) của chuỗi nặng của BRCA84D; và

(B) biến đổi vùng Fc có đột biến thế: L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể thể khảm hoặc kháng thể được biến đổi giống như của người.

Sáng chế còn đề xuất kháng thể được phân lập nêu trên hoặc mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể này, trong đó kháng thể chứa:

(A) chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự axit amin hBRCA84D-2 VL (SEQ ID NO: 89);

(B) chuỗi nặng biến đổi có trình tự axit amin hBRCA84D-2 VH (SEQ ID NO: 99); và

(C) vùng Fc có đột biến thế: L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L.

Sáng chế cũng đề xuất tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng mà liên kết đặc hiệu với miền ngoại bào của B7-H3, trong đó kháng thể này cạnh tranh để liên kết với B7-H3 với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể: BRCA69D, BRCA84D hoặc PRCA157.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá kháng thể được phân lập hoặc mảnh phản ứng miễn dịch bất kỳ trong số các kháng thể được phân lập hoặc mảnh phản ứng miễn dịch nêu trên.

Sáng chế còn đề xuất chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép (DART™), chất phản ứng này bao gồm:

(A) chuỗi polypeptit I chứa miền liên kết epitop VL globulin miễn dịch liên kết

đặc hiệu với B7-H3 và miền liên kết epitop VH liên kết đặc hiệu với phân tử khác B7-H3; và

- (B) mạch polypeptit II chứa miền liên kết epitop VH globulin miễn dịch liên kết đặc hiệu với B7-H3 và miền liên kết epitop VL liên kết đặc hiệu với phân tử khác B7-H3;

trong đó các mạch polypeptit I và II được kết hợp với nhau để tạo thành miền liên kết epitop chức năng có khả năng liên kết với B7-H3 và phân tử khác B7-H3.

Sáng chế cũng đề xuất chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép (DART™) nêu trên, trong đó phân tử khác B7-H3 mà có thể được liên kết với DART™ là kháng nguyên không hoàn toàn và cụ thể trong đó kháng nguyên không hoàn toàn là isothioxyanat fluorescein.

Sáng chế còn đề xuất chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép (DART™) nêu trên, trong đó phân tử khác B7-H3 mà có thể được liên kết với DART™ là thụ thể tế bào T hoặc thụ thể NKG2D.

Sáng chế cũng đề xuất chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép (DART™) nêu trên, trong đó phân tử khác B7-H3 mà có thể được liên kết với DART™ là kháng nguyên liên quan đến khối u và cụ thể là kháng nguyên liên quan đến khối u được chọn từ nhóm bao gồm A33; ADAM-9; ALCAM; BAGE; beta-catenin; CA125; carboxypeptidaza M; CD103; CD19; CD20; CD22; CD23; CD25; CD27; CD28; CD36; CD40/CD154; CD45; CD46; CD5; CD56; CD79a/CD79b; CDK4; CEA; CTLA4; Cytokeratin 8; EGF-R; EphA2; ErbB1; ErbB3; ErbB4; GAGE-1; GAGE-2; GD2/GD3/GM2; gp100; HER-2/neu; papilomvirus-E6 của người; papilomvirus-E7 của người; Integrin Alpha-V-Beta-6; JAM-3; KID3; KID31; KSA (17-1A); LUCA-2; MAGE-1; MAGE-3; MART; MUC-1; MUM-1; N-acetylglucosaminyltransferaza; Oncostatin M; p15; PIPA; PSA; PSMA; ROR1; sTn; thụ thể TNF-β; thụ thể TNF-α; thụ thể TNF-γ; thụ thể transferin; và thụ thể VEGF.

Sáng chế cũng đề xuất phân tử axit nucleic mã hoá mạch polypeptit của chất phản ứng bất kỳ trong số các chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép (DART™) nêu

trên.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm chứa (i) lượng hữu hiệu điều trị của bất kỳ trong số kháng thể được phân lập hoặc mảnh phản ứng miễn dịch hoặc chất phản ứng đổi mục tiêu có ái lực kép (DART™s) nêu trên và (ii) chất mang được dụng.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể được biến đổi giống như của người chứa:

- (A) miền biến đổi chứa CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 5), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 9) của chuỗi nhẹ của BRCA84D và CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 13), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17) của chuỗi nặng của BRCA84D; và
- (B) biến đổi vùng Fc có đột biến thế: L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm nêu trên, trong đó kháng thể này là kháng thể được biến đổi giống như của người chứa:

- (A) chuỗi nhẹ biến đổi có trình tự axit amin hBRCA84D-2 VL (SEQ ID NO: 89);
- (B) chuỗi nặng biến đổi có trình tự axit amin hBRCA84D-2 VH (SEQ ID NO: 99); và
- (C) vùng Fc có đột biến thế: L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L.

Sáng chế cũng đề xuất được phẩm bất kỳ trong số các được phẩm nêu trên, mà còn chứa một hoặc nhiều chất chống ung thư bổ sung và cụ thể trong đó chất chống ung thư bổ sung này là chất hoá trị, chất xạ trị, chất trị liệu hormon hoặc chất trị liệu miễn dịch.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng bất kỳ trong số kháng thể hoặc mảnh phản ứng miễn dịch hoặc chất phản ứng đổi mục tiêu có ái lực kép (DART™) nêu trên trong chẩn đoán ung thư, trong đó kháng thể được phân lập, mảnh phản ứng miễn dịch hoặc DART™ được đánh dấu để phát hiện được.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng ở trên đặc trưng ở chỗ bệnh ung thư này đặc

trung ở chỗ có mặt tế bào ung thư được chọn từ nhóm bao gồm tế bào của khối u tuyến thượng thận, ung thư liên quan đến AIDS, sacom phần mềm phế nang, u tế bào hình sao, ung thư bàng quang, ung thư xương, ung thư não và dây cột sống, u não di căn, ung thư vú, u thể động mạch cảnh, ung thư cổ tử cung, sacom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ màu, caxinom thể tế bào sáng, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, u mô bào sợi lạnh tính từ da, u cầu nhỏ tạo mô xơ, u màng não thất, u Ewing, sacom sụn nhầy ngoài xương, tạo xơ xương bất toàn, loạn sản xơ xương, ung thư túi mật hoặc ống mật, ung thư dạ dày, bệnh nguyên bào nuôi do thai nghén, u tế bào mầm, ung thư đầu và cổ, caxinom gan, u tế bào đảo, sacom Kaposi, ung thư thận, bệnh bạch cầu, u mỡ lạnh tính/u mỡ, u mỡ ác tính/sacom mỡ, ung thư gan, u bạch huyết, ung thư phổi, u nguyên bào tủy, u hắc tố, u màng não, ung thư đa nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, u nội tiết thần kinh, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, u tuyến cận giáp, ung thư nhi, u bao thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crom, u tuyến yên, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư hắc tố mạch nhỏ sau, rối loạn gan hiếm gặp, ung thư di căn ở thận, u hình gậy, sacom cơ vân, sacom, ung thư da, sacom mô mềm, ung thư tế bào vảy, ung thư dạ dày, sarcom hoạt dịch, ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, ung thư di căn tuyến giáp và ung thư tử cung.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng kháng thể hoặc mảnh phản ứng miễn dịch hoặc chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép (DART™s) bất kỳ trong số các chất nêu trên trong việc bào chế thuốc để điều trị hoặc ngăn ngừa bệnh ung thư ở người bệnh. Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng này đặc trưng ở chỗ bệnh ung thư này đặc trưng ở chỗ có mặt tế bào ung thư được chọn từ nhóm bao gồm tế bào của khối u tuyến thượng thận, ung thư liên quan đến AIDS, sacom phần mềm phế nang, u tế bào hình sao, ung thư bàng quang, ung thư xương, ung thư não và dây cột sống, u não di căn, ung thư vú, u thể động mạch cảnh, ung thư cổ tử cung, sacom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ màu, caxinom thể tế bào sáng, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, u mô bào sợi lạnh tính từ da, u cầu nhỏ tạo mô xơ, u màng não thất, u Ewing, sacom sụn nhầy ngoài xương, tạo xơ xương bất toàn, loạn sản xơ xương, ung thư túi mật hoặc ống mật, ung thư dạ dày, bệnh nguyên bào nuôi do thai nghén, u tế bào mầm, ung thư đầu và cổ, caxinom gan, u tế bào đảo, sacom Kaposi, ung thư thận, bệnh bạch cầu, u mỡ lạnh tính/u mỡ, u mỡ ác tính/sacom mỡ, ung thư gan, u bạch huyết, ung thư phổi, u nguyên bào tủy,

u hắc tố, u màng não, ung thư đa nội tiết, đa u tuỷ, hội chứng loạn sản tuỷ, u nguyên bào thần kinh, u nội tiết thần kinh, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, u tuyến cận giáp, ung thư nhi, u bao thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crom, u tuyến yên, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư hắc tố mạch nhỏ sau, rối loạn gan hiếm gặp, ung thư di căn ở thận, u hình gậy, sacom cơ vân, sacom, ung thư da, sacom mô mềm, ung thư tế bào vảy, ung thư dạ dày, sarcom hoạt dịch, ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, ung thư di căn tuyến giáp và ung thư tử cung.

Sáng chế cũng mô tả việc sử dụng nêu trên đặc trưng ở chỗ việc sử dụng này còn bao gồm sử dụng một hoặc nhiều phương pháp điều trị bệnh ung thư bổ sung được chọn từ nhóm bao gồm hoá trị, trị liệu miễn dịch, xạ trị, trị liệu hormon và phẫu thuật.

### **Mô tả vắn tắt các hình vẽ**

Fig.1A-Fig.1B thể hiện kết quả đánh giá IHC được tiến hành trên các mẫu mô tụy, gan, phổi và ruột kết bình thường với BRCA84D ở các nồng độ 0,625µg/mL và 0,078µg/mL (Fig.1A) và các mô tim, thận và thượng thận bình thường với BRCA84D ở nồng độ 0,625 µg/mL (Fig.1B).

Fig.2 thể hiện kết quả đánh giá IHC được tiến hành trên các mẫu mô tụy, vú, ruột kết và phổi với BRCA84D ở các nồng độ 0,625µg/mL và 0,078µg/mL.

Fig.3A-Fig.3D thể hiện sự tiêu diệt đổi hướng phụ thuộc vào liều được điều tiết bởi kháng thể theo sáng chế. Fig.3A-Fig.3B thể hiện sự tiêu diệt đổi hướng đối với tế bào caxinom thận A498 phụ thuộc vào liều (với PBMC không hoạt động ở thời điểm 18 giờ (LDH)) bởi kháng thể đơn dòng phản ứng kháng B7-H3 (tỷ lệ tác động:đích là 20:1) Fig.3A: BRCA68D, BRCA69D, PRCA157, GB8, TCR-4420; Fig.3B: OVCA22, BRCA84D, TDH6, TES7, TCR-4420). Fig.3C-Fig.3D thể hiện sự tiêu diệt đổi hướng đối với tế bào ung thư phổi A549 phụ thuộc theo liều (với PBMC không hoạt động ở thời điểm 18 giờ (LDH)) bởi kháng thể đơn dòng phản ứng kháng B7-H3 (tỷ lệ tác động:đích là 30:1) (Fig.3C: BRCA84D, OVCA22, PRCA157, TES7; Fig.3D: TDH6, BRCA68D, BRCA69D).

Fig.4A-Fig.4B thể hiện khả năng của kháng thể kháng B7-H3 có thể liên kết với B7H3-2Ig hoà tan (Fig.4A) và B7H3-4Ig B7-H3 hoà tan (Fig.4B) (nồng độ kháng thể



là 100 nM). Chú thích: (A) BLA8; (B) BRCA165; (C) BRCA68D; (D) BRCA69D; (E) BRCA84D; (F) GB8; (G) LUCA1; (H) LUCA50; (I) OVCA21; (J) OVCA22; (K) PA20; (L) PRCA123; (M) SG24; (N) SG27; (O) STO9; (P) TDH4 (184-192); (Q) TDH4; (R) TDH5; (S) TES7. Vị trí thẳng đứng của chú thích tương quan với vị trí của đường cong tương ứng.

Fig.5A-Fig.5S minh họa ái lực liên kết giữa kháng nguyên trong dung dịch và kháng thể đơn dòng bị bắt giữ (các đường nét liền; B7-H3(4Ig) 100 nM; các đường nét đứt, B7-H3, 100 nM).

Fig.6A-Fig.6I thể hiện kết quả phân tích BIACORE™ của kháng thể B7-H3 cố định vào B7-H3-2Ig (các đường màu xám nét đứt) hoặc B7-H3-4Ig (các đường màu đen nét liền). Kháng thể được chuẩn độ từ 0,063  $\mu$ M đến 1  $\mu$ M. Thời gian tính bằng giây.

Fig.7 là kết quả so sánh phân tích BIACORE™ của kháng thể PRCA157, BRCA69D, BLA8, PA20, BRCA84D, GB8 và SG27.

Fig.8 là kết quả so sánh BIACORE™ chứng minh rằng kháng thể BRCA68D, BRCA69D và PRCA157 không cạnh tranh với BRCA84D để liên kết với B7-H3 của người.

Fig.9A-Fig.9B thể hiện kết quả thử nghiệm khả năng của kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế có thể trở nên được thu nhận khi liên kết với tế bào ung thư (Fig.9A, tế bào CSC tuyến tiền liệt; Fig.9B, tế bào tụy Hs700t).

Fig.10A-Fig.10F thể hiện khả năng của kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế có thể phong bế chéo nhau nhờ đó bộc lộ epitop trùng lặp hoặc khác biệt. Một lượng dư gấp 10 lần của kháng thể cạnh tranh được sử dụng.

Fig.11A-Fig.11B thể hiện việc sắp trình tự của gốc axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi (Fig.11A) hoặc chuỗi nặng biến đổi (Fig.11B) của BRCA84D và dẫn xuất được biến đổi giống như của người của nó là hBRCA84D.

Fig.12 thể hiện ái lực liên kết tương đối của các dẫn xuất chuỗi nhẹ hBRCA84D là BRCA84D-3VL, BRCA84D-4VL và BRCA84D-5VL với B7-H3 của người.

Fig.13 thể hiện ái lực liên kết tương đối của các dẫn xuất của chuỗi nặng hBRCA84D là BRCA84D-2VH, BRCA84D-3VH và BRCA84D-4VH với B7-H3 của

người.

Fig.14 thể hiện ái lực liên kết tương đối của (1) kháng thể chứa hBRCA84D-2VL và hBRCA84D-2VH (các thử nghiệm 1 và 2), (2) BRCA84D thể khảm, (3) kháng thể chứa hBRCA84D-5VL và BRCA84D-HC thể khảm và (4) kháng thể chứa hBRCA84D-5VL và hBRCA84D-2VH.

Fig.15 thể hiện khả năng của kháng thể kháng B7-H3 được biến đổi giống như của người được biến đổi Fc để ức chế sự phát triển khối u của tế bào caxinom bằng quang HT-1197 *in vivo* trong hệ mô hình ghép khác loài ở chuột. Kháng thể hBRCA84D-2 được biến đổi Fc (gồm các biến đổi Fc là L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L) được dùng cho chuột nhắt (ở liều 1 µg/kg, 10µg/kg, hoặc 20 µg/kg) vào 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau khi cấy tế bào ung thư.

Fig.16 thể hiện khả năng của kháng thể kháng B7-H3 được biến đổi giống như của người được biến đổi Fc để ức chế sự phát triển khối u của tế bào caxinom thận A498 *in vivo* trong hệ mô hình ghép khác loài ở chuột. Kháng thể hBRCA84D-2 được biến đổi Fc (gồm các biến đổi Fc là L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L) được dùng cho chuột nhắt (ở liều 1 µg/kg, 10µg/kg, hoặc 20 µg/kg) vào 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau khi cấy tế bào ung thư.

Fig.17A-Fig.17D chứng minh khả năng của hBRCA84D-2/DART™ kháng TCR (“T-DART™”) trong việc điều tiết sự tiêu diệt đối hướng đối với tế bào ung thư phổi SK-MES-1, tế bào caxinom thận A498, tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCaP và tế bào ung thư hắc tố UACC-62.

Fig.18A-Fig.18C thể hiện sự phân hủy dược động học của kháng thể Mab1 kháng B7-H3 trong huyết thanh của chuột nhắt đực không có khối u đực mCD16-/-, hCD16A\_FOXN1 (Fig.18A-Fig.18B). Fig.18C thể hiện profin dược động học được dự đoán trước được tạo ra bằng cách sử dụng mô hình 2 thành phần với và các thông số từ liều 5mg/kg ở 0,1, 0,5, 1, 5 và 10mg/kg.

Fig.19 thể hiện sự biểu hiện tương đối HER2 và PRCA135 bởi dòng ung thư bằng quang HT-1197.

Fig.20 thể hiện ái lực liên kết của các biến thể hBRCA84D của kháng thể kháng

B7-H3 với tế bào HT-1197.

Fig.21A-Fig.21C thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho HT-1197. Nhóm gồm 8 chuột nhất cái nhận chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 10mg/kg, hoặc cetuximab ở liều 1, 5 hoặc 15mg/kg hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 ở liều 0,1, 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg (Q7D x5). Các phép đo khối u được thực hiện cách 3-4 ngày. Fig.28A thể hiện khả năng của kháng thể Mab1 kháng B7-H3 trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột. So sánh với đối chứng IgG: Mab1 (1 và 5 mg/kg) với đối chứng IgG \*\*\* từ ngày 51; Mab1 (10mg/kg) với đối chứng IgG \*\* từ ngày 48. Fig.21B thể hiện khả năng của cetuximab trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột. Cetuximab (7 mg/kg) với đối chứng IgG \*\* từ ngày 51; Cetuximab (15 mg/kg) với đối chứng IgG \*\*\* từ ngày 58. Fig.21C so sánh các kết quả thu được ở liều tối đa được thử nghiệm.

Fig.22A-Fig.22B thể hiện sự biểu hiện tương đối HER2 và PMSA bởi dòng ung thư bàng quang HT-1376.

Fig.23 thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho HT-1376. Các nhóm chuột nhất nhận chất dẫn thuốc hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 1,0 mg/kg (Q7D x4).

Fig.24 thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho AGS. Các nhóm chuột nhất nhận chất dẫn thuốc hoặc 10mg/kg kháng thể Mab1 kháng B7-H3 ở liều 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg (Q7D x5).

Fig.25 thể hiện kết quả thử nghiệm gây độc tế bào *in vitro* ở tế bào ung thư phổi A549 khi ủ với các biến thể hBRCA84D, chBRCA84D và hBRCA84 (Fc Var1) của kháng thể kháng B7-H3 (tỷ lệ E:T = 25:1; Tế bào tác động = PBMC của người; Kết quả độc thử nghiệm LDH).

Fig.26 thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho A549. Các nhóm chuột nhất nhận chất dẫn thuốc hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 1,0 mg/kg (Q7D x4).

Fig.27 thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho CaLu3. Các nhóm

chuột nhất nhận chất dẫn thuốc hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 0,5, 1 hoặc 5 mg/kg (Q7D x5) hoặc đối chứng IgG (10mg/mL).

Fig.28A-Fig.28C thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho tế bào ung thư hắc tố LOX-IMVI. Các nhóm gồm 8 con chuột nhất cái nhận chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 5 mg/kg, hoặc Docetaxel ở liều 5, 10 hoặc 20 mg/kg hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 ở liều 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Fig.21A thể hiện khả năng của kháng thể Mab1 kháng B7-H3 trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột. Fig.28B thể hiện khả năng của Docetaxel trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột. Fig.28C so sánh kết quả thu được ở liều tối đa được thử nghiệm.

Fig.29 thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho tế bào ung thư hắc tố UACC-62. Các nhóm chuột nhất nhận chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 5mg/kg, hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 ở liều 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg.

Fig.30A-Fig.30C thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho tế bào ung thư tuyến tiền liệt 2rv. Các nhóm gồm 8 con chuột nhất cái nhận chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 10mg/kg, hoặc trastuzumab ở liều 1, 7 hoặc 15 mg/kg hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 ở liều 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Fig.30A thể hiện khả năng của kháng thể Mab1 kháng B7-H3 trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột. Fig.30B thể hiện khả năng của trastuzumab trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột. Fig.30C so sánh kết quả thu được ở liều tối đa được thử nghiệm.

Fig.31 thể hiện kết quả thử nghiệm gây độc tế bào *in vitro* của tế bào ung thư thận A498 khi ủ với các kháng thể kháng B7-H3 biến thể là hBRCA84D, chBRCA84D và hBRCA84 (Fc Var1) (tỷ lệ E:T = 25:1; Dạng đáp ứng = PBMC của người; Kết quả độc thử nghiệm LDH).

Fig.32 thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho tế bào ung thư thận A498. Các nhóm chuột nhất nhận chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 10mg/kg, hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 ở liều 0,1, 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Centuximab (kháng thể kháng EGRF) được dùng cho nhóm đối chứng gồm chuột nhất ở liều 1, 7, hoặc 15 mg/kg.

Fig.33A-Fig.33B thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho tế bào ung thư thận 786-0 so với centuximab. Các nhóm chuột nhất nhận chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 10mg/kg, hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 ở liều 0,1, 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Centuximab (kháng thể kháng EGRF) được dùng cho nhóm đối chứng gồm chuột nhất ở liều 1, 7, hoặc 15 mg/kg.

Fig.34 thể hiện kết quả phân tích ghép khác loài ở chuột cho tế bào ung thư thận 786-0 so với paclitaxel. Các nhóm chuột nhất nhận chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 5 mg/kg, hoặc kháng thể Mab1 kháng B7-H3 ở liều 0,1, 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Paclitaxel được dùng cho nhóm đối chứng gồm tám con chuột nhất ở liều 2,5mg/kg.

### **Mô tả chi tiết sáng chế**

Sáng chế đề cập đến kháng thể và mảnh kháng thể mà phản ứng miễn dịch với thụ thể B7-H3 của động vật có vú, và cụ thể hơn là thụ thể B7-H3 của người và việc sử dụng chúng, cụ thể là trong điều trị bệnh ung thư và chứng viêm. Do đó, sáng chế đề cập cụ thể kháng thể có phản ứng với B7-H3 được biến đổi giống như của người và mảnh phản ứng miễn dịch của kháng thể này mà có khả năng điều tiết, và tốt hơn nữa nếu tăng cường quá trình hoạt hoá hệ miễn dịch nhằm kháng tế bào ung thư có liên quan đến nhiều bệnh ung thư khác nhau ở người.

#### **I. Kỹ thuật chung**

Theo thực tiễn sáng chế sẽ sử dụng, trừ khi có quy định khác, kỹ thuật thông thường trong sinh học phân tử (bao gồm kỹ thuật tái tổ hợp), vi sinh vật học, sinh học tế bào, sinh hoá và miễn dịch, đã biết bởi người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Các kỹ thuật này được giải thích toàn bộ trong tài liệu kỹ thuật như MOLECULAR CLONING: A LABORATORY MANUAL, Third Edition (Sambrook et al. Eds., 2001) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS: METHODS AND APPLICATIONS (Methods in Molecular Biology), Herdewijn, P., Ed., Humana Press, Totowa, NJ; OLIGONUCLEOTIDE SYNTHESIS (Gait, M.J., Ed., 1984); METHODS IN MOLECULAR BIOLOGY, Humana Press, Totowa, NJ; CELL BIOLOGY: A LABORATORY NOTEBOOK (Cellis, J.E., Ed., 1998) Academic Press, New York, NY; ANIMAL CELL CULTURE (Freshney, R.I., Ed., 1987); INTRODUCTION TO CELL AND TISSUE CULTURE (Mather, J.P. and Roberts, P.E., Eds., 1998) Plenum Press, New York,

NY; CELL AND TISSUE CULTURE: LABORATORY PROCEDURES (Doyle, A. et al., Eds., 1993-8) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; METHODS IN ENZYMOLOGY (Academic Press, Inc.) New York, NY; WEIR'S HANDBOOK OF EXPERIMENTAL IMMUNOLOGY (Herzenberg, L.A. et al. Eds. 1997) Wiley-Blackwell Publishers, New York, NY; GENE TRANSFER VECTORS FOR MAMMALIAN CELLS (Miller, J.M. et al. Eds., 1987) Cold Spring Harbor Press, Cold Spring Harbor, NY; CURRENT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (Ausubel, F.M. et al., Eds., 1987) Greene Pub. Associates, New York, NY; PCR: THE POLYMERASE CHAIN REACTION, (Mullis, K. et al., Eds., 1994) Birkhäuser, Boston MA; CURRENT PROTOCOLS IN IMMUNOLOGY (Coligan, J.E. et al., eds., 1991) John Wiley and Sons, Hoboken, NJ; SHORT PROTOCOLS IN MOLECULAR BIOLOGY (John Wiley and Sons, 1999) Hoboken, NJ; IMMUNOBIOLOGY 7 (Janeway, C.A. et al. 2007) Garland Science, London, UK; Antibodies (P. Finch, 1997) Stride Publications, Devoran, UK; ANTIBODIES: A PRACTICAL APPROACH (D. Catty., ed., 1989) Oxford University Press, USA, New York NY); MONOCLONAL ANTIBODIES: A PRACTICAL APPROACH (Shepherd, P. et al. Eds., 2000) Oxford University Press, USA, New York NY; USING ANTIBODIES: A LABORATORY MANUAL (Harlow, E. et al. Eds., 1998) Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; THE ANTIBODIES (Zanetti, M. et al. Eds. 1995) Harwood Academic Publishers, London, UK); and DEVITA, HELLMAN, AND ROSENBERG'S CANCER: PRINCIPLES & PRACTICE OF ONCOLOGY, EIGHTH EDITION, DeVita, V. et al. Eds. 2008, Lippincott Williams & Wilkins, Philadelphia, PA.

## II. Các định nghĩa

Trong bản mô tả, thuật ngữ “B7-H3” chỉ thành viên thuộc họ protein B7 của người, protein màng loại I với miền giống Ig còn được biết là CD276. Thuật ngữ “2Ig-B7-H3” chỉ dạng B7-H3 mà chỉ gồm hai miền giống Ig; thuật ngữ “4Ig-B7-H3” chỉ dạng B7-H3 gồm bốn miền giống Ig (xem Sun, M. et al. (2002) “Characterization of Mouse and Human B7-H3 Genes”, J. Immunol. 168:6294-6297; Steinberger et al. (2004), “Molecular Characterization Of Human 4Ig-B7-H3, A Member Of The B7 Family With Four Ig-Like Domains”, J. Immunol. 2004, 172(4):2352-2359 và Castriconi et al. (2004) “Identification Of 4Ig-B7-H3 As A Neuroblastoma-Associated

Molecule That Exerts A Protective Role From An NK Cell-Mediated Lysis”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 101(34):12640-12645). Kháng nguyên “TES7” (WO 2008/066691) là kháng nguyên có chung các đặc tính của 4Ig-B7-H3. Do đó, kháng thể liên kết đặc hiệu với TES7 liên kết với 4Ig-B7-H3. Kháng nguyên TES7 có thể có nhiều hơn một epitop khác và epitop này có thể là không thẳng. Các kháng thể kháng B7-H3 đã biết là liên kết với epitop không thẳng, bao gồm một số chỉ có mặt ở dạng đồng phân 4Ig-B7-H3. Hiện nay người ta tin rằng TES7 có thể được biểu hiện quá mức ở một số tế bào ung thư nhất định so với ở tế bào mô thường.

Chất chủ vận, chất đối kháng và các tác nhân điều biến khác của chức năng B7-H3 rõ ràng là có trong trong phạm vi của sáng chế. Chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến này là polypeptit gồm một hoặc nhiều vị trí xác định kháng nguyên của B7-H3, hoặc gồm một hoặc nhiều mảnh của các vị trí này, biến thể của các vị trí này hoặc chất ngưng tụ peptit của các vị trí này. Chất chủ vận, chất đối kháng và hợp chất điều biến B7-H3 có thể có dạng mạch thẳng hoặc mạch vòng và tùy ý bao gồm ít nhất một gốc axit amin không thường được tìm thấy trong tự nhiên hoặc ít nhất một đẳng vị amit. Các hợp chất này có thể được glycosyl hoá.

Cụ thể hơn, thuật ngữ “tác nhân điều biến B7-H3” trong bản mô tả được xác định là hợp chất bất kỳ mà (1) có khả năng phá vỡ hoặc phong bế tương tác giữa B7-H3 của người và phối tử tự nhiên của nó hoặc kháng thể kháng B7-H3; (2) có khả năng liên kết với B7-H3 của người và phối tử tự nhiên của nó hoặc kháng thể kháng B7-H3; (3) gồm vị trí kháng nguyên có thể được sử dụng để tăng khả năng liên kết của kháng thể với B7-H3 của người và phối tử tự nhiên của nó hoặc kháng thể kháng B7-H3; (4) gồm vị trí kháng nguyên có thể được sử dụng để sàng lọc kháng thể có khả năng liên kết với B7-H3 của người và phối tử tự nhiên của nó hoặc kháng thể kháng B7-H3; (5) gồm vị trí kháng nguyên có thể được sử dụng để tăng lượng kháng thể có khả năng phá vỡ hoặc phong bế tương tác giữa B7-H3 của người và phối tử tự nhiên của nó hoặc kháng thể kháng B7-H3; (6) gồm vị trí kháng nguyên có thể được sử dụng để sàng lọc kháng thể có khả năng phá vỡ hoặc phong bế tương tác giữa B7-H3 của người và phối tử tự nhiên của nó hoặc kháng thể kháng B7-H3. Các tác nhân điều biến B7-H3 có thể là “chất chủ vận B7-H3” hoặc “chất đối kháng B7-H3” phụ thuộc vào xem hoạt tính của chúng có

lần lượt tăng cường quá trình hoạt hoá tế bào T hoặc ức chế quá trình hoạt hoá tế bào T hay không.

Chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến B7-H3 bao gồm biến thể B7-H3, chất đối kháng peptit B7-H3, chất ngưng trệ pepit và phân tử nhỏ, kháng thể kháng B7-H3 và biến thể globulin miễn dịch, biến thể axit amin của B7-H3 của người bao gồm biến thể mang đột biến thể, xoá và bổ sung axit amin, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng và globulin miễn dịch thể khảm. Chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến B7-H3 theo sáng chế được dựa trên việc xác định các miền B7-H3 tham gia vào quá trình liên kết B7-H3 của người với phối tử tự nhiên của nó hoặc kháng thể kháng B7-H3. Do đó, sáng chế đề cập đến chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến B7-H3 với cấu trúc phân tử là bản sao hoặc ngưng trệ một hoặc nhiều miền liên kết kháng B7-H3 của B7-H3 của người.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “biến thể B7-H3” biểu thị biến thể axit amin bất kỳ của B7-H3 của người, bao gồm đột biến thể, xoá và bổ sung axit amin, hoặc kết hợp bất kỳ của chúng. Định nghĩa này bao hàm phân tử thể khảm như thể khảm B7-H3 của người/không phải của người và các phân tử lai khác. Thuật ngữ này cũng được bao gồm trong phần định nghĩa về mảnh bất kỳ của phân tử biến thể B7-H3 chứa biến thể hoặc (các) vùng lai của phân tử.

Trong bản mô tả, “kháng thể” là phân tử globulin miễn dịch có khả năng liên kết đặc hiệu với đích, như hydrat cacbon, polynucleotit, lipid, polypeptit, v.v.. qua ít nhất một vị trí nhận biết kháng nguyên, nằm trong vùng biến đổi của phân tử globulin miễn dịch. Trong bản mô tả, thuật ngữ này không chỉ bao hàm kháng thể đa dòng hoặc đơn dòng nguyên vẹn, mà còn bao hàm các mảnh kháng thể (như Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), chuỗi đơn (ScFv), thể đột biến của chúng, biến thể có trong tự nhiên, protein dung hợp gồm phần kháng thể với vị trí nhận biết kháng nguyên có độ đặc hiệu cần thiết, kháng thể được biến đổi giống như của người, kháng thể thể khảm, “BiTEs®”, phân tử “DART™” và cấu hình biến đổi bất kỳ khác của phân tử globulin miễn dịch gồm vị trí nhận biết kháng nguyên có độ đặc hiệu cần thiết.

Thuật ngữ “BiTE” (bi-specific T-cell engager: chất gắn tế bào T đặc hiệu kép) chỉ phân tử mạch polypeptit đơn có hai miền liên kết kháng nguyên, trong số đó một



miền liên kết với kháng nguyên tế bào T và miền thứ hai liên kết với kháng nguyên có mặt trên bề mặt của đích ( WO 05/061547; Baeuerle, P et al. (2008) “BiTE®: A New Class Of Antibodies That Recruit T Cells”, *Drugs of the Future* 33: 137-147; Bargou, et al. 2008) “Tumor Regression in Cancer Patients by Very Low Doses of a T Cell-Engaging Antibody”, *Science* 321: 974-977).

Thuật ngữ “DART™” (chất phản ứng đổi mục tiêu có ái lực kép) chỉ phân tử globulin miễn dịch chứa ít nhất hai mạch polypeptit kết hợp với nhau (đặc biệt là qua tương tác cộng hoá trị) để tạo thành ít nhất hai vị trí liên kết epitop, mà có thể nhận dạng các epitop giống nhau hoặc khác nhau. Mỗi mạch polypeptit của DART™ gồm vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch và vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch, nhưng các vùng này không tương tác để tạo thành vị trí liên kết epitop. Ngoài ra, vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch của một trong số các mạch polypeptit (ví dụ, mạch thứ nhất) của DART™ tương tác với vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của mạch polypeptit khác (ví dụ, mạch thứ hai) của DART™ để tạo thành vị trí liên kết epitop. Tương tự, vùng biến đổi chuỗi nhẹ globulin miễn dịch của một trong số các mạch polypeptit (ví dụ, mạch thứ nhất) của DART™ tương tác với vùng biến đổi chuỗi nặng globulin miễn dịch của mạch polypeptit khác (ví dụ, mạch thứ hai) của DART™ để tạo thành vị trí liên kết epitop. DART™ có thể là đơn đặc hiệu, đặc hiệu kép, đặc hiệu ba vị trí, v.v., do vậy có thể đồng thời liên kết với một, hai, ba hoặc nhiều hơn ba epitop khác nhau (mà có thể là của cùng kháng nguyên hoặc các kháng nguyên khác nhau). Ngoài ra, DART™ có thể có hoá trị một, hoá trị hai, hoá trị ba, hoá trị bốn, hoá trị năm, hoá trị sáu, v.v., do vậy có thể đồng thời liên kết với một, hai, ba, bốn, năm, sáu phân tử hoặc nhiều hơn. Hai thuộc tính này của DART™ (tức là mức độ đặc hiệu và hoá trị có thể được kết hợp, ví dụ, để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép (tức là có khả năng liên kết với hai epitop) có hoá trị bốn (tức là có khả năng liên kết với bốn nhóm epitop), v.v.. Phân tử DART™ được bộc lộ trong Công bố đơn PCT số WO 2006/113665, WO 2008/157379 và WO 2010/080538.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” chỉ nhóm kháng thể đồng nhất trong đó kháng thể đơn dòng gồm có axit amin (có trong tự nhiên và không có trong tự nhiên) mà tham gia vào quá trình liên kết chọn lọc với kháng nguyên. Kháng thể đơn dòng có độ đặc

hiệu cao, được hướng đến một vị trí kháng nguyên. Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” không chỉ bao hàm kháng thể đơn dòng nguyên vẹn và kháng thể đơn dòng có độ dài đầy đủ, mà còn bao gồm các mảnh kháng thể (như Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv), chuỗi đơn (ScFv), thể đột biến của chúng, protein dung hợp gồm phần kháng thể, kháng thể đơn dòng được biến đổi giống như của người, kháng thể đơn dòng thể khảm và cấu hình biến đổi khác của phân tử globulin miễn dịch gồm vị trí nhận biết kháng nguyên có độ đặc hiệu cần thiết và khả năng liên kết với kháng nguyên. Sáng chế không được dự định sẽ làm giới hạn về nguồn kháng thể hoặc cách thức tạo ra kháng thể này (ví dụ, bằng tế bào lai, chọn lọc thể thực khuẩn, biểu hiện tái tổ hợp, động vật chuyển gen, v.v.). Thuật ngữ này bao gồm globulin miễn dịch toàn phần cũng như mảnh, v.v.. nêu trên theo định nghĩa về “kháng thể.”

Thuật ngữ “kháng thể được biến đổi giống như của người” chỉ phân tử thể khảm, thường được điều chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp, có vị trí liên kết kháng nguyên thu được từ globulin miễn dịch từ loài không phải con người và cấu trúc globulin miễn dịch còn lại của phân tử được dựa trên cấu trúc và/hoặc trình tự của globulin miễn dịch của người. Vị trí liên kết kháng nguyên có thể chứa miền biến đổi hoàn toàn được dung hợp trên miền hằng định hoặc chỉ chứa vùng quyết định tính bổ sung (CDR) được ghép trên vùng khung thích hợp trong miền biến đổi. Các vị trí liên kết kháng nguyên có thể là kiểu đại hoặc được biến đổi bằng cách thay thế một hoặc nhiều axit amin. Điều này loại bỏ vùng hằng định làm tác nhân sinh miễn dịch trong cá thể người, nhưng vẫn còn khả năng về đáp ứng miễn dịch với vùng biến đổi ngoại lai (LoBuglio, A.F. et al. (1989) “Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 86:4220-4224). Một phương pháp tiếp cận khác không chỉ tập trung tạo ra vùng hằng định có nguồn gốc từ người, mà còn tập trung biến đổi vùng biến đổi cũng như tạo đổi hình dạng để chúng có dạng gần với dạng của người nhất có thể. Đã biết rằng vùng biến đổi của cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chứa ba vùng quyết định tính bổ sung (CDR) khác nhau về đáp ứng với kháng nguyên đang nói đến và quyết định về khả năng liên kết, nằm bên sườn bốn vùng khung (FR) được bảo toàn tương đối ở loài đã cho và được cho là tạo giả định cấu trúc cuộn gấp cho CDR. Khi kháng thể không phải của người được tạo ra đối với kháng nguyên cụ thể, vùng biến đổi có thể “được tạo đổi hình dạng” hoặc “được biến đổi giống như của

người” bằng cách ghép CDR thu được từ kháng thể không phải của người lên FR có trên kháng thể của người cần biến đổi. Việc ứng dụng phương pháp này cho các kháng thể khác nhau đã được báo cáo theo Sato, K. (1993) *Cancer Res* 53:851-856. Riechmann, L. et al. (1988) “Reshaping Human Antibodies for Therapy”, *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) “Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity”, *Science* 239:1534-1536; Kettleborough, C. A. et al. (1991) “Humanization Of A Mouse Monoclonal Antibody By CDR-Grafting: The Importance Of Framework Residues On Loop Conformation”, *Protein Engineering* 4:773-3783; Maeda, H. et al. (1991) “Construction Of Reshaped Human Antibodies With HIV-Neutralizing Activity”, *Human Antibodies Hybridoma* 2:124-134; Gorman, S. D. et al. (1991) “Reshaping A Therapeutic CD4 Antibody”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:4181-4185; Tempest, P.R. et al. (1991) “Reshaping A Human Monoclonal Antibody To Inhibit Human Respiratory Syncytial Virus Infection in vivo”, *Bio/Technology* 9:266-271; Co, M. S. et al. (1991) “Humanized Antibodies For Antiviral Therapy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 88:2869-2873; Carter, P. et al. (1992) “Humanization Of An Anti-p185her2 Antibody For Human Cancer Therapy”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 89:4285-4289; và Co, M.S. et al. (1992) “Chimeric And Humanized Antibodies With Specificity For The CD33 Antigen”, *J. Immunol.* 148:1149-1154. Theo một số phương án, kháng thể được biến đổi giống như của người bảo toàn tất cả các trình tự CDR (ví dụ, kháng thể của chuột nhắt được biến đổi giống như của người mà chứa toàn bộ sáu CDR từ kháng thể của chuột nhắt). Theo các phương án khác, kháng thể được biến đổi giống như của người có một hoặc nhiều CDR (một, hai, ba, bốn, năm, sáu) được biến đổi so với kháng thể ban đầu, còn được gọi là một hoặc nhiều CDR “thu được từ” một hoặc nhiều CDR từ kháng thể ban đầu.

Trong bản mô tả, kháng thể hoặc polypeptit được coi là liên kết “đặc hiệu” với một vùng khác của phân tử (tức là epitop) khi nó phản ứng hoặc liên kết một cách thường xuyên hơn, nhanh hơn, có thời lượng lâu hơn và/hoặc có ái lực lớn hơn với epitop này so với các epitop khác. Ví dụ, kháng thể liên kết đặc hiệu với epitop B7-H3 là kháng thể liên kết với epitop B7-H3 có ái lực, tổng ái lực, lớn hơn, dễ dàng hơn và/hoặc có thời lượng lâu hơn so với khi nó liên kết với các epitop B7-H3 khác hoặc epitop không phải epitop B7-H3. Khi đọc định nghĩa này cũng cần phải hiểu rằng, ví

dự, kháng thể (hoặc gốc hoặc epitop) liên kết đặc hiệu với đích thứ nhất có thể hoặc có thể không liên kết đặc hiệu hoặc ưu tiên với đích thứ hai. Do đó, “liên kết đặc hiệu” không nhất thiết yêu cầu (mặc dù thuật ngữ này có thể bao gồm) liên kết đặc hữu. Nói chung, nhưng không nhất thiết, khi nói đến liên kết nghĩa là liên kết “đặc hiệu”.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “có hoạt tính miễn dịch” theo sáng chế chỉ epitop có hoặc “giữ được hoạt tính miễn dịch” chỉ khả năng của kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng B7-H3) có thể liên kết với epitop trong các điều kiện khác nhau, ví dụ, sau khi epitop đã được đưa vào các điều kiện làm giảm và làm biến tính.

Nhiều chức năng sinh học khác nhau liên quan đến kháng thể kháng B7-H3 bao gồm, nhưng không giới hạn ở một hoặc nhiều chức năng sau: khả năng liên kết đặc hiệu với B7-H3 (và cụ thể là phân tử B7-H3 được biểu hiện trên bề mặt của tế bào ung thư, bao gồm nhưng không giới hạn ở, tế bào ung thư thận, tuyến tiền liệt hoặc phổi); khả năng ức chế cạnh tranh đối với liên kết ưu tiên của kháng thể kháng B7-H3 đã biết với B7-H3, bao gồm khả năng liên kết ưu tiên với cùng epitop B7-H3 mà kháng thể gốc liên kết ưu tiên với epitop này; khả năng liên kết với một phần của B7-H3 lộ ra trên bề mặt của tế bào sống in vitro hoặc in vivo; khả năng liên kết với một phần của B7-H3 mà lộ ra trên bề mặt của tế bào ung thư sống chẳng hạn như, nhưng không giới hạn ở, tế bào ung thư tuyến tiền liệt, phổi hoặc thận; khả năng vận chuyển chất hoá trị đến tế bào ung thư (như tế bào ung thư thận, tuyến tiền liệt hoặc phổi) biểu hiện B7-H3 trên bề mặt tế bào; và/hoặc khả năng vận chuyển chất trị liệu hoặc chất đánh dấu phát hiện được trên tế bào ung thư biểu hiện B7-H3 trên bề mặt tế bào. Như được mô tả ở đây, polypeptit (bao gồm kháng thể) theo sáng chế có thể có một hoặc nhiều đặc tính trong số các đặc tính này.

“Kháng thể tương đương kháng B7-H3” hoặc “polypeptit tương đương kháng B7-H3” chỉ kháng thể hoặc polypeptit có một hoặc nhiều chức năng sinh học liên quan đến kháng thể kháng B7-H3 như, ví dụ, độ đặc hiệu liên kết.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “chất” chỉ hợp chất sinh học, dược hoặc hoá học. Ví dụ không giới hạn bao gồm phân tử hữu cơ hoặc vô cơ đơn giản hoặc dạng phức, peptit, protein, oligonucleotit, kháng thể, dẫn xuất kháng thể, mảnh kháng thể, dẫn xuất vitamin, hydrat cacbon, độc tố hoặc hợp chất hoá trị. Các hợp chất khác nhau có thể

được tổng hợp, ví dụ, phân tử nhỏ và oligome (ví dụ, oligopeptit và oligonucleotit), và hợp chất hữu cơ tổng hợp dựa trên các cấu trúc lõi khác nhau. Ngoài ra, các nguồn tự nhiên khác nhau có thể cung cấp các hợp chất để sàng lọc, như chiết phẩm từ thực vật hoặc động vật và dạng tương tự.

Chất được sử dụng theo các phương pháp theo sáng chế có thể được chọn ngẫu nhiên hoặc được chọn hoặc được thiết kế theo tỷ lệ. Trong bản mô tả, chất gọi là được chọn ngẫu nhiên khi chất này được chọn không cần phải xem xét hoặc biết trước về axit amin cụ thể hoặc các gốc hoá học khác tham gia vào quá trình liên kết phân tử với (các) đối tác liên kết tự nhiên của nó hoặc kháng thể đã biết. Ví dụ về chất được chọn ngẫu nhiên là chất được nhận biết bằng cách sàng lọc thư viện hoá chất hoặc thư viện tổ hợp peptit.

Trong bản mô tả, chất gọi là được chọn hoặc được thiết kế theo tỷ lệ khi chất này được chọn trên cơ sở không ngẫu nhiên xem xét đến trình tự của vị trí đích và/hoặc cấu hình của nó liên quan đến hoạt động của chất. Đối với chất kháng B7-H3, hiện nay người ta tin rằng có ít nhất ba epitop trên B7-H3 mà kháng thể có thể được làm kháng và do vậy có ít nhất ba vị trí hoạt động cho chất phong bế tương tác B7-H3/kháng B7-H3. Sáng chế cũng bao gồm chất hoạt động ở các vị trí tương tác giữa B7-H3 và đối tác liên kết tự nhiên của nó, mặc dù các phối tử khác và vị trí tương tác B7-H3 hoạt tính của chúng cũng được bao gồm trong phạm vi của sáng chế, dù hiện đã biết hay được nhận dạng sau. Chất có thể được chọn hoặc được thiết kế theo tỷ lệ bằng cách sử dụng trình tự peptit tạo thành vị trí tiếp xúc của phức hợp thụ thể/phối tử và/hoặc B7-H3/kháng thể kháng B7-H3. Ví dụ, chất peptit được chọn theo tỷ lệ có thể là peptit có trình tự axit amin giống hệt với epitop xuất hiện trên B7-H3 khi nó lộ ra trên bề mặt của tế bào sống trong môi trường tự nhiên của tế bào này. Các chất này sẽ làm giảm hoặc phong bế quá trình liên kết kháng thể kháng B7-H3 với B7-H3 hoặc quá trình liên kết B7-H3 với phối tử tự nhiên của nó, nếu muốn, bằng cách liên kết với kháng thể kháng B7-H3 hoặc với phối tử tự nhiên.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “được đánh dấu” đối với kháng thể được dự định là bao gồm việc đánh dấu trực tiếp lên kháng thể bằng cách ghép cặp (tức là liên kết vật lý) chất dễ phát hiện, như chất phóng xạ hoặc chất huỳnh quang (ví dụ phycoerythrin

(PE) hoặc isothioxyanat fluorescein (còn được biết là floisothioxyanat hoặc FITC)) với kháng thể, cũng như đánh dấu gián tiếp lên mẫu dò hoặc kháng thể nhờ tính phản ứng với chất dễ phát hiện.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “liên kết” đối với kháng thể bao gồm sự gắn kết hoặc liên kết cộng hoá trị và không cộng hoá trị của chất (ví dụ, chất hoá trị) với kháng thể. Kháng thể có thể liên kết với chất (ví dụ, chất hoá trị) bằng cách liên kết trực tiếp hoặc liên kết gián tiếp với các nền thông thường, sao cho kháng thể này điều khiển quá trình định vị chất đến tế bào ung thư mà kháng thể liên kết với tế bào này và trong đó kháng thể và chất này hầu như là không phân ly trong các điều kiện sinh lý sao cho chất này không hướng đích đến tế bào ung thư mà kháng thể liên kết với tế bào này hoặc sao cho hiệu lực của chất không bị giảm xuống.

Thuật ngữ “mẫu sinh học” bao gồm nhiều loại mẫu khác nhau thu được từ cá thể và có thể được sử dụng trong thử nghiệm chẩn đoán hoặc kiểm soát. Định nghĩa này bao gồm mẫu nước bọt, mẫu máu và các mẫu chất lỏng khác có nguồn gốc sinh học, mẫu mô rắn như mẫu sinh thiết hoặc mẫu nuôi cấy mô hoặc tế bào được lấy từ đối tượng và dòng con của chúng, ví dụ, tế bào thu được từ mẫu mô được thu gom từ cá thể nghi mắc bệnh ung thư từ mô buồng trứng, phổi, tuyến tiền liệt, tụy, ruột kết và vú theo các phương án được ưu tiên. Định nghĩa này còn bao gồm mẫu đã được thao tác thủ công theo cách bất kỳ sau khi thu được, như bằng cách xử lý với chất phản ứng, hoà tan hoặc làm giàu về các thành phần nhất định, như các protein hoặc polynucleotit, hoặc được nhúng vào trong mạng nền bán rắn hoặc rắn nhằm mục đích phân chia. Thuật ngữ “mẫu sinh học” bao gồm mẫu lâm sàng và còn bao gồm tế bào được nuôi cấy, dịch nổi tế bào, chất rửa giải, huyết thanh, huyết tương, dịch sinh học và mẫu mô.

Thuật ngữ “tế bào chủ” bao gồm tế bào của cá thể hoặc dịch nuôi cấy tế bào mà có thể là vector hoặc đã nhận vector để đưa đoạn chèn polynucleotit vào. Tế bào chủ bao gồm dòng con của một tế bào chủ và dòng con này có thể không nhất thiết phải giống hệt (về hình thái hoặc về thành phần bổ sung ADN bộ gen) với tế bào gốc ban đầu do đột biến tự nhiên, ngẫu nhiên hoặc có chủ ý. Tế bào chủ bao gồm tế bào được chuyển nhiễm in vivo với polynucleotit theo sáng chế.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “làm chậm tiến triển của di căn” có nghĩa là làm

chậm, ngăn cản, làm trễ, làm muộn, làm ổn định và/hoặc trì hoãn tiến triển của di căn. Độ chậm này có thể có khoảng thời gian khác nhau, phụ thuộc vào bệnh sử của bệnh ung thư và/hoặc cá thể được điều trị. Do hiển nhiên với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, độ chậm thích hợp hoặc đáng kể có thể, nếu có tác dụng, bao gồm ngăn ngừa, trong đó cá thể không phát triển di căn.

Trong bản mô tả, “lượng hữu hiệu” của dược phẩm theo một phương án là lượng đủ để đem lại kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm, không giới hạn, kết quả lâm sàng như thu nhỏ kích thước khối u (trong bối cảnh về bệnh ung thư, ví dụ, vùng thư vú hoặc tuyến tiền liệt), làm chậm quá trình phát triển của tế bào ung thư, làm chậm tiến triển của di căn, làm giảm các triệu chứng của bệnh, tăng chất lượng sống của người bệnh, giảm liều của các dược phẩm khác cần để điều trị bệnh, tăng cường tác dụng của một thuốc khác như bằng cách hướng đích và/hoặc thu nhận, làm chậm sự tiến triển bệnh và/hoặc kéo dài sự sống của cá thể. Lượng hữu hiệu có thể được dùng một hoặc nhiều lần. Theo mục đích của sáng chế, lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất hoặc dược phẩm là lượng đủ để làm giảm quá trình tăng sinh (hoặc tiêu hủy) tế bào ung thư và làm giảm và/hoặc làm chậm sự tiến triển hoặc sự phát triển của di căn tế bào ung thư theo cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Theo một số phương án, lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất hoặc dược phẩm có thể hoặc có thể không đạt được trong dạng tiếp hợp với thuốc, hợp chất hoặc dược phẩm khác. Do đó, “lượng hữu hiệu” có thể được xét đến trong bối cảnh dùng một hoặc nhiều chất hoá trị và một chất có thể được coi là được xét đưa ra với lượng hữu hiệu nếu trong dạng tiếp hợp với một hoặc nhiều chất khác có thể đạt được kết quả mong muốn. Trong khi nhu cầu của cá thể là khác nhau, việc xác định khoảng giá trị tối ưu của lượng hữu hiệu của mỗi thành phần là đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Liều điển hình thường nằm trong khoảng từ 0,1 đến 100mg/kg/thể trọng. Liều được ưu tiên thường nằm trong khoảng từ 1 đến 100mg/kg/thể trọng. Liều được ưu tiên nhất thường nằm trong khoảng từ 10 đến 100 mg/kg/thể trọng.

Trong bản mô tả, phân tử axit nucleic hoặc chất, kháng thể, chế phẩm hoặc tế bào, v.v., “được phân lập” khi phân tử axit nucleic, chất, kháng thể, hợp phần hoặc tế bào này, v.v. về cơ bản được tách ra khỏi phân tử axit nucleic, kháng thể, chất, hợp phần

hoặc tế bào, v.v. pha tạp có trong các nguồn tự nhiên.

Thuật ngữ “cá thể” chỉ động vật có xương sống, tốt hơn là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, người, gia súc, động vật dùng trong thể thao, thú cưng, linh trưởng, chuột nhắt và chuột cống. Theo phương án được ưu tiên nhất, thuật ngữ “cá thể” này chỉ người.

Thuật ngữ “polypeptit”, “oligopeptit”, “peptit” và “protein” được sử dụng thay thế lẫn nhau ở đây chỉ polyme của axit amin có độ dài bất kỳ. Polyme này có thể có mạch thẳng hoặc mạch nhánh, nó có thể chứa axit amin biến đổi và nó có thể là bị ngắt quãng bởi các thành phần không phải axit amin. Thuật ngữ này còn bao gồm polyme axit amin mà đã được biến đổi theo cách tự nhiên hoặc nhân tạo; ví dụ, tạo liên kết disulfua, glycosyl hoá, lipit hoá, axetyl hoá, phosphoryl hoá hoặc các kỹ thuật thao tác hoặc biến đổi khác, như tạo tiếp hợp với thành phần đánh dấu. Thuật ngữ này còn bao gồm, ví dụ, các polypeptit chứa một hoặc nhiều chất tương tự với axit amin (bao gồm, ví dụ, axit amin không tự nhiên, v.v.), cũng như các cách biến đổi khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cần hiểu rằng, vì polypeptit theo sáng chế được dựa trên kháng thể, nên polypeptit này có thể có dưới dạng mạch đơn hoặc mạch kết hợp.

Phạm vi của sáng chế cũng bao gồm chất nguy trang peptit của chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến peptit B7-H3 (bao gồm kháng thể kháng B7-H3) được mô tả ở đây. Chất nguy trang peptit này bao gồm peptit trong đó ít nhất một gốc axit amin được thế bằng gốc axit amin không thường được tìm thấy trong tự nhiên, như chất đồng phân dạng D của axit amin này hoặc loại được N-alkyl hoá của axit amin này. Theo các phương án khác, chất nguy trang peptit được tạo ra bằng cách thay thế ít nhất một liên kết amit ( $-C(=O)-NH-$ ) trong chất chủ vận, chất đối kháng hoặc các tác nhân điều biến peptit B7-H3 bằng chất đẳng vị amit. Chất đẳng vị amit thích hợp bao gồm  $-CH_2-NH-$ ,  $-CH_2-S-$ ,  $-CH_2-S(O)-$ ,  $-CH_2-S(O)_2-$ ,  $-CH_2-CH_2-$ ,  $-CH=CH-$  (dạng E hoặc Z),  $-C(=O)-CH_2-$ ,  $-CH(CN)-NH-$ ,  $C(OH)-CH_2-$  và  $-O-C(=O)-NH-$ . Liên kết amit trong chất chủ vận, chất đối kháng hoặc tác nhân điều biến peptit B7-H3 là ứng viên thích hợp để thay thế bằng chất đẳng vị amit bao gồm liên kết thủy phân được bằng esteaza hoặc proteaza nội sinh của đối tượng dự định của chất chủ vận, chất đối kháng hoặc tác nhân điều biến peptit B7-H3.



Trong bản mô tả, thuật ngữ “về cơ bản là tinh khiết” chỉ nguyên liệu mà có độ tinh khiết là ít nhất 50% (tức là không chứa chất tạp nhiễm), tốt hơn nữa nếu có độ tinh khiết là ít nhất 90%, tốt hơn nữa là ít nhất 95%, tốt hơn nữa là ít nhất 98%, tốt hơn nữa là ít nhất 99%, và tốt nhất là cao hơn 99%.

Trong bản mô tả, thuật ngữ “độc tố” chỉ chất bất kỳ mà tạo ra đáp ứng bất lợi ở tế bào. Ví dụ, độc tố được nhắm đến tế bào ung thư sẽ có tác dụng bất lợi, đôi khi là có hại, cho tế bào ung thư. Ví dụ về các độc tố bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, taxan, maytansinoid, auristatin (ví dụ, monomethyl auristatin (MMAE), monomethyl auristatin F (MMAF), auristatin E (AE), v.v.) (như các chất được bộc lộ trong Patent Mỹ số 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,441,163; 6,596,757; 7,276,497; 7,585,857; hoặc 7,851,432), calicheamixin, an anthracyclin (ví dụ doxorubicin), chất tương tự CC-1065, docetaxel, cathepsin B hoặc E; ricin, gelonin, ngoại độc tố *Pseudomonas*, độc tố diphtheria, và ARNaza; kháng thể được đánh dấu phóng xạ (ví dụ, được tiếp hợp với tiuxetan hoặc được đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ gây độc (ví dụ,  $^{90}\text{Y}$ ;  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ , v.v.)).

Trong bản mô tả, thuật ngữ “việc điều trị” hoặc “điều trị” mô tả phương pháp tiếp cận để thu được kết quả có lợi hoặc mong muốn bao gồm và tốt hơn nếu là kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn. Kết quả lâm sàng có lợi hoặc mong muốn này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều kết quả sau đây: giảm quá trình tăng sinh (hoặc tiêu hủy) tế bào ung thư hoặc tế bào bệnh khác, giảm sự di căn của tế bào ung thư được tìm thấy ở bệnh ung thư, thu nhỏ kích thước khối u, giảm triệu chứng của bệnh, tăng chất lượng sống người bệnh, giảm liều của các thuốc khác cần để điều trị bệnh, làm chậm tiến triển của bệnh và/hoặc kéo dài sự sống của cá thể.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ “bệnh ung thư” được dự định bao hàm các bệnh ung thư đặc trưng ở chỗ có mặt tế bào ung thư được chọn từ nhóm bao gồm tế bào của khối u tuyến thượng thận, ung thư liên quan đến AIDS, sarcom phần mềm phế nang, u tế bào hình sao, ung thư bàng quang (caxinom tế bào vảy và caxinom tế bào chuyển tiếp), ung thư xương (u men răng, nang xương phình mạch, u xương sụn, sarcom xương), ung thư não và dây cột sống, u não di căn, ung thư vú, u thể động mạch cảnh, ung thư cổ tử cung, sarcom sụn, u nguyên sống, caxinom tế bào thận kỵ màu,

caxinom thể tế bào sáng, ung thư ruột kết, ung thư trực tràng, u mô bào sợi lạnh tính từ da, u cầu nhỏ tạo mô xơ, u màng não thất, u Ewing, sacom sụn nhầy ngoài xương, tạo xơ xương bất toàn, loạn sản xơ xương, ung thư túi mật hoặc ống mật, ung thư dạ dày, bệnh nguyên bào nuôi do thai nghén, u tế bào mầm, ung thư đầu và cổ, caxinom gan, u tế bào đảo, sacom Kaposi, ung thư thận (u nguyên bào thận phôi, caxinom tế bào thận nhú), bệnh bạch cầu, u mỡ lạnh tính/u mỡ, u mỡ ác tính/sacom mỡ, ung thư gan (u nguyên bào gan, caxinom tế bào gan), u bạch huyết, ung thư phổi, u nguyên bào tủy, u hắc tố, u màng não, ung thư đa nội tiết, đa u tủy, hội chứng loạn sản tủy, u nguyên bào thần kinh, u nội tiết thần kinh, ung thư buồng trứng, ung thư tụy, caxinom tuyến giáp dạng nhú, u tuyến cận giáp, ung thư nhi, u bao thần kinh ngoại vi, u tế bào ưa crom, u tuyến yên, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư hắc tố mạch nhỏ sau, rối loạn gan hiếm gặp, ung thư di căn ở thận, u hình gậy, sacom cơ vân, sacom, ung thư da, sacom mô mềm, ung thư tế bào vảy, ung thư dạ dày, sarcom hoạt dịch, ung thư tinh hoàn, caxinom tuyến ức, u tuyến ức, ung thư di căn tuyến giáp và ung thư tử cung (caxinom ở cổ tử cung, caxinom áo niêm mạc tử cung, và u cơ trơn).

### III. Các phương pháp tạo ra kháng thể và polypeptit

Các phương pháp tạo ra kháng thể đơn dòng là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Một phương pháp có thể được sử dụng là phương pháp theo tài liệu Kohler, G. (1975) "Continuous Cultures Of Fused Cells Secreting Antibody Of Preddefined Specificity", Nature 256:495-497 hoặc cải biến của phương pháp này. Thông thường, kháng thể đơn dòng được tạo ra ở các loài không phải người, như chuột nhắt. Nhìn chung, chuột nhắt hoặc chuột cống được sử dụng để tạo miễn dịch nhưng các động vật khác cũng có thể được sử dụng. Kháng thể được tạo ra bằng cách tạo miễn dịch chuột nhắt bằng lượng miễn dịch của tế bào, dịch chiết tế bào hoặc chế phẩm protein có chứa B7-H3 của người. Tác nhân sinh miễn dịch có thể là, nhưng không bị giới hạn ở, tế bào sơ cấp, dòng tế bào được nuôi cấy, tế bào ung thư, axit nucleic hoặc mô. Theo một phương án, tế bào caxinom phổi của người được sử dụng. Tế bào được sử dụng để tạo miễn dịch, ví dụ, tế bào tinh hoàn hoặc ung thư tuyến tụy hoặc dạ dày của người, có thể được nuôi cấy trong một khoảng thời gian (ví dụ, ít nhất 24 giờ) trước khi sử dụng chúng làm tác nhân sinh miễn dịch. Chính tế bào (ví dụ, tế bào ung thư tuyến tinh hoàn,

dạ dày hoặc tụy của người) có thể được sử dụng làm tác nhân sinh miễn dịch hoặc kết hợp với tá được không gây biến tính, như Ribì. Nhìn chung, tế bào cần được giữ nguyên vẹn và tốt hơn là còn sống khi được sử dụng làm tác nhân sinh miễn dịch. Tế bào nguyên vẹn có thể cho phép phát hiện kháng nguyên tốt hơn so với tế bào bị phá hủy bởi động vật được tạo miễn dịch. Việc sử dụng tá được gây biến tính hoặc không lành, ví dụ, tá được Freud, có thể phá hủy tế bào và do vậy không được khuyến khích. Tác nhân sinh miễn dịch có thể được dùng nhiều lần theo khoảng cách định kỳ như cách hai tuần hoặc hàng tuần, hoặc có thể được dùng theo cách sao cho duy trì được sự sống sót ở động vật (ví dụ, ở mô tái tổ hợp).

Theo một phương án, kháng thể đơn dòng liên kết với B7-H3 thu được bằng cách sử dụng tế bào chủ biểu hiện quá mức B7-H3 làm tác nhân sinh miễn dịch. Tế bào này bao gồm, lấy làm ví dụ và không nhằm giới hạn, tế bào caxinom phổi của người và tế bào ung thư ruột kết của người.

Để kiểm soát đáp ứng kháng thể, mẫu sinh học nhỏ (ví dụ, máu) có thể thu được từ động vật và được thử nghiệm với hiệu giá kháng thể kháng tác nhân sinh miễn dịch. Lá lách và/hoặc một số hạch bạch huyết lớn có thể được loại bỏ và được phân ly vào một tế bào. Nếu muốn, tế bào lá lách có thể được sàng lọc (sau khi loại bỏ tế bào bám không đặc hiệu) bằng cách đưa thể huyền phù tế bào lên đĩa hoặc giếng đã được phủ kháng nguyên. Tế bào B, biểu hiện globulin miễn dịch liên kết màng đặc hiệu đối với kháng nguyên, sẽ liên kết với đĩa này và không được tráng bằng phần còn lại của huyền phù. Tế bào B thu được, hoặc tất cả các tế bào lá lách đã phân ly, sau đó có thể được dung hợp với tế bào u tủy (ví dụ, X63- Ag8,653 và tế bào từ Viện Salk, Trung tâm phân bố tế bào (Salk Institute, Cell Distribution Center), San Diego, CA). Polyetylen glycol (PEG) có thể được sử dụng để dung hợp tế bào lá lách hoặc các lympho bào với tế bào u tủy để tạo thành tế bào lai. Tế bào lai này sau đó được nuôi cấy trong môi trường chọn lọc (ví dụ, môi trường hypoxanthin, aminopterin, thymidin, còn được biết là “môi trường HAT”). Tế bào lai thu được sau đó được dàn bằng cách pha loãng giới hạn và được thử nghiệm tạo ra kháng thể liên kết đặc hiệu với tác nhân sinh miễn dịch, sử dụng, ví dụ, FACS (phân loại tế bào được hoạt hoá huỳnh quang) hoặc sàng lọc hoá mô miễn dịch (IHC). Sau đó, tế bào lai tiết kháng thể đơn dòng được chọn được nuôi cấy in vitro

(ví dụ, trong các chai nuôi cấy mô hoặc thiết bị phản ứng sợi rỗng) hoặc in vivo (ví dụ, làm cổ trưởng ở chuột nhắt).

Theo một kỹ thuật khác thay thế cho kỹ thuật dung hợp tế bào, tế bào B được làm bất tử virus Epstein-Barr (EBV) có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể đơn dòng theo sáng chế. Tế bào lai được khuếch đại và được tách dòng phụ nếu muốn, và dịch nổi được thử nghiệm hoạt tính kháng tác nhân sinh miễn dịch bằng các quy trình thử nghiệm thông thường (ví dụ, FACS, IHC, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, thử nghiệm miễn dịch enzym, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, v.v.).

Theo một cách khác, kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 và kháng thể tương đương bất kỳ khác có thể được giải trình tự và được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, biến đổi giống như của người, sử dụng chuột nhắt chuyển gen để tạo ra kháng thể của người hoàn toàn, công nghệ biểu hiện thể thực khuẩn, v.v.). Theo một phương án, kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 được giải trình tự và sau đó trình tự polynucleotit được tách dòng vào vector để biểu hiện hoặc nhân giống. Trình tự mã hoá kháng thể được quan tâm có thể được giữ trong vector ở tế bào chủ và tế bào chủ này có thể được mở rộng và được làm đông lạnh để sử dụng sau này.

Trình tự polynucleotit của kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 và kháng thể tương đương bất kỳ khác có thể được sử dụng bằng cách thao tác di truyền để tạo ra kháng thể “được biến đổi giống như của người” để cải thiện ái lực hoặc các đặc tính khác của kháng thể. Nguyên lý chung trong việc biến đổi giống như của người đối với kháng thể bao gồm bước giữ lại trình tự bazơ của phần liên kết kháng nguyên của kháng thể, trong khi hoán đổi phần còn lại không phải của người trên kháng thể với trình tự kháng thể của người. Có bốn bước cơ bản để biến đổi giống như của người đối với kháng thể đơn dòng. Đó là: (1) xác định nucleotit và trình tự axit amin định trước của các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng kháng thể bắt đầu (2) thiết kế kháng thể được biến đổi giống như của người, tức là xác định vùng khung kháng thể để sử dụng trong quá trình biến đổi giống như của người (3) phương pháp/kỹ thuật biến đổi giống như của người thực tế và (4) chuyển nhiễm và biểu hiện kháng thể được biến đổi giống như của người. Ví dụ, xem Patent Mỹ số 4,816,567; 5,807,715; 5,866,692; và 6,331,415.

Số lượng phân tử kháng thể “được biến đổi giống như của người” gồm vị trí liên kết kháng nguyên thu được từ globulin miễn dịch không phải của người đã được mô tả, bao gồm kháng thể thể khảm có hoặc vùng V của động vật gặm nhấm hoặc của động vật gặm nhấm được biến đổi và vùng quyết định tính bổ sung (CDR) kết hợp của chúng được dung hợp với miền hằng định của người (ví dụ, xem Winter et al. (1991) “Man-made Antibodies”, *Nature* 349:293-299; Lobuglio et al. (1989) “Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody In Man: Kinetics And Immune Response”, *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 86:4220-4224 (1989), Shaw et al. (1987) “Characterization Of A Mouse/Human Chimeric Monoclonal Antibody (17-1A) To A Colon Cancer Tumor-Associated Antigen”, *J. Immunol.* 138:4534-4538, và Brown et al. (1987) “Tumor-Specific Genetically Engineered Murine/Human Chimeric Monoclonal Antibody”, *Cancer Res.* 47:3577-3583). Các tài liệu khác mô tả CDR của động vật gặm nhấm được ghép vào vùng khung (FR) hỗ trợ người trước khi dung hợp với miền hằng định kháng thể của người thích hợp (ví dụ, xem Riechmann, L. et al. (1988) “Reshaping Human Antibodies for Therapy”, *Nature* 332:323-327; Verhoeyen, M. et al. (1988) “Reshaping Human Antibodies: Grafting An Antilysozyme Activity”, *Science* 239:1534-1536; và Jones et al. (1986) “Replacing The Complementarity-Determining Regions In A Human Antibody With Those From A Mouse”, *Nature* 321:522-525). Một tài liệu khác mô tả CDR của động vật gặm nhấm được hỗ trợ bởi vùng khung của động vật gặm nhấm được phủ theo cách tái tổ hợp. Ví dụ, xem Công bố đơn châu Âu số 519,596. Các phân tử “được biến đổi giống như của người” này được thiết kế để làm giảm thiểu đáp ứng miễn dịch không mong muốn đối với phân tử kháng thể của người ở động vật gặm nhấm mà giới hạn thời lượng và tác dụng của ứng dụng trị liệu của các gốc này trong thể nhận của người. Các phương pháp khác để biến đổi giống như của người đối với kháng thể cũng có thể được sử dụng đã được bộc lộ bởi tài liệu Daugherty et al. (1991) “Polymerase Chain Reaction Facilitates The Cloning, CDR-Grafting, And Rapid Expression Of A Murine Monoclonal Antibody Directed Against The CD18 Component Of Leukocyte Integrins”, *Nucl. Acids Res.* 19:2471-2476 và trong Patent Mỹ số 6,180,377; 6,054,297; 5,997,867; và 5,866,692.

Sáng chế còn bao gồm các mảnh vùng biến đổi chuỗi đơn (“scFv”) của kháng thể theo sáng chế, như kháng thể kháng B7-H3 của chuột. Các mảnh trong vùng biến

đổi chuỗi đơn được tạo ra bằng cách liên kết các vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng bằng cách sử dụng liên kết peptit ngắn. Tài liệu Bird et al. (1988) ("Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426) mô tả ví dụ về peptit liên kết tạo cầu nối dài xấp xỉ 3,5 nm giữa đầu tận carboxy của một vùng biến đổi và đầu tận amino của vùng biến đổi khác. Thành phần liên kết có trình tự khác đã được thiết kế và được sử dụng (Bird et al. (1988) "Single-Chain Antigen-Binding Proteins", Science 242:423-426). Thành phần liên kết có thể được biến đổi lần lượt để có các chức năng bổ sung, như gắn thuốc hoặc gắn lên giá đỡ dạng rắn. Biến thể chuỗi đơn có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Để tạo ra scFv theo cách tổng hợp, thiết bị tổng hợp tự động có thể được sử dụng. Để tạo ra scFv theo cách tái tổ hợp, plasmit thích hợp chứa polynucleotit mã hoá scFv có thể được đưa vào tế bào chủ thích hợp, là tế bào sinh vật nhân chuẩn, như tế bào nấm men, thực vật, côn trùng hoặc động vật có vú, hoặc tế bào sinh vật nhân sơ, như E. coli. Polynucleotit mã hoá scFv được quan tâm có thể được tạo ra bằng các thao tác thông thường như nối các polynucleotit. scFv thu được có thể được phân lập sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein tiêu chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế bao gồm các biến đổi đối với kháng thể và các polypeptit liên kết với B7-H3 và chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến của chúng, bao gồm kháng thể và polypeptit tương đương về mặt chức năng mà không ảnh hưởng đáng kể đến các tính chất của chúng và biến thể có hoạt tính tăng cường hoặc giảm. Việc biến đổi polypeptit là kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này và không cần phải được mô tả chi tiết ở đây. Ví dụ về polypeptit biến đổi bao gồm polypeptit có thay thế bảo toàn các gốc axit amin, làm khuyết hoặc thêm vào một hoặc nhiều axit amin mà không làm thay đổi hoạt tính chức năng đáng kể theo cách có hại, hoặc sử dụng các chất tương tự về mặt hoá học. Gốc axit amin mà có thể được thay thế theo cách bảo toàn với nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở: glyxin/alanin; valin/isoleuxin/leuxin; asparagin/glutamin; axit aspartic/axit glutamic; serin/threonin; lysin/arginin; và phenylalanin/tryosin. Các polypeptit này còn bao gồm polypeptit được glycosyl hoá và không glycosyl hoá, cũng như các polypeptit có các biến đổi sau dịch mã khác như, ví dụ, glycosyl hoá bằng các đường khác nhau, axetyl hoá và phosphoryl hoá. Tốt hơn nếu đột biến thế axit amin sẽ được bảo toàn, tức là axit amin được thế sẽ có các tính chất

hoá học tương tự như axit amin ban đầu. Đột biến thể bảo toàn này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, và ví dụ đã được nêu ở trên. Các biến đổi axit amin có thể bao gồm từ thay đổi hoặc biến đổi một hoặc nhiều axit amin để thiết kế lại hoàn toàn một vùng, như vùng biến đổi. Các thay đổi về vùng biến đổi có thể làm thay đổi ái lực liên kết và/hoặc độ đặc hiệu. Các phương pháp biến đổi khác bao gồm sử dụng kỹ thuật bất cập đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp sử dụng enzym, thế oxy hoá và cànghoá. Các biến đổi có thể được sử dụng, ví dụ, để gắn các chất đánh dấu dùng cho thử nghiệm miễn dịch, như gắn gốc hoạt động phóng xạ dùng cho thử nghiệm miễn dịch phóng xạ. Các polypeptit biến đổi được tạo ra bằng cách sử dụng các quy trình đã thiết lập trong lĩnh vực kỹ thuật này và có thể được sàng lọc bằng cách sử dụng các thử nghiệm chuẩn đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế còn bao gồm protein dung hợp gồm một hoặc nhiều mảnh hoặc vùng từ polypeptit và kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, polypeptit dung hợp bao gồm ít nhất là 10 axit amin liên tiếp của vùng chuỗi nhẹ biến đổi và ít nhất 10 axit amin của vùng chuỗi nặng biến đổi. Theo một phương án khác, polypeptit dung hợp chứa vùng hằng định globulin miễn dịch khác loại. Theo một phương án khác, polypeptit dung hợp chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ và vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể được tạo ra từ tế bào lai được lưu công khai. Theo các mục đích của sáng chế, protein dung hợp kháng thể chứa một hoặc nhiều miền polypeptit liên kết đặc hiệu với B7-H3 và một trình tự axit amin khác mà không được gắn vào protein này trong phân tử tự nhiên, ví dụ, trình tự khác loại hoặc trình tự tương đồng từ một vùng khác.

Polypeptit kháng B7-H3 và chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến B7-H3 khác có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, theo cách tổng hợp hoặc tái tổ hợp. Một phương pháp tạo ra chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến peptit B7-H3 bao gồm tổng hợp hoá học đối với polypeptit, sau đó là xử lý dưới điều kiện oxy hoá thích hợp để thu được cấu hình tự nhiên, tức là liên kết disulfua đúng. Điều này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem Kelley, R. F. et al. (1990) In: GENETIC ENGINEERING PRINCIPLES AND METHODS, Setlow, J.K. Ed., Plenum Press, N.Y., vol. 12, pp 1-19; Stewart, J.M et al.

(1984) SOLID PHASE PEPTIDE SYNTHESIS, Pierce Chemical Co., Rockford, IL; xem cả Patent Mỹ số 4,105,603; 3,972,859; 3,842,067; và 3,862,925).

Polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra thuận lợi bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp peptit pha rắn (Merrifield, B. (1986) "Solid Phase Synthesis", Science 232(4748):341-347; Houghten, R.A. (1985) "General Method For The Rapid Solid-Phase Synthesis Of Large Numbers Of Peptides: Specificity Of Antigen-Antibody Interaction At The Level Of Individual Amino Acids", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 82(15):5131-5135; Ganesan, A. (2006) "Solid-Phase Synthesis In The Twenty-First Century", Mini Rev. Med. Chem. 6(1):3-10).

Theo một phương án khác, kháng thể của người hoàn toàn có thể thu được bằng cách sử dụng chuột nhắt có trên thị trường đã được thao tác di truyền để biểu hiện các protein globulin miễn dịch của người đặc hiệu. Động vật chuyển gen mà được thiết kế để tạo ra đáp ứng miễn dịch mong muốn hơn (ví dụ, kháng thể của người hoàn toàn) hoặc mạnh hơn cũng có thể được sử dụng để tạo ra kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể của người. Ví dụ về công nghệ này là XENOMOUSE™ (Abgenix, Inc, Fremont, CA) và HUMAB-MOUSE® và TC MOUSE™ (cả hai đều từ Medarex, Inc, Princeton, NJ).

Theo một phương án khác, kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp và được biểu hiện bằng cách sử dụng phương pháp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng cách đầu tiên là phân lập kháng thể được tạo ra từ động vật chủ, thu trình tự gen và sử dụng trình tự gen này để biểu hiện kháng thể theo cách tái tổ hợp ở tế bào chủ (ví dụ, tế bào CHO). Một phương pháp khác có thể được sử dụng để biểu hiện trình tự kháng thể ở thực vật (ví dụ, cây thuốc lá) hoặc sữa chuyển gen. Các phương pháp thích hợp để biểu hiện kháng thể theo cách tái tổ hợp ở cây hoặc sữa đã được bộc lộ (ví dụ, xem Peeters et al. (2001) "Production Of Antibodies And Antibody Fragments In Plants", Vaccine 19:2756; Lonberg, N. et al. (1995) "Human Antibodies From Transgenic Mice", Int. Rev. Immunol 13:65-93; and Pollock et al.(1999) "Transgenic Milk As A Method For The Production Of Recombinant Antibodies", J. Immunol Methods 231:147-157). Các phương pháp thích hợp để tạo ra dẫn xuất của kháng thể, ví dụ, được biến đổi giống như



của người, chuỗi đơn, v.v. là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một cách khác, kháng thể có thể được tạo ra theo cách tái tổ hợp bằng kỹ thuật biểu hiện thể thực khuẩn (ví dụ, xem Patent Mỹ số 5,565,332; 5,580,717; 5,733,743; 6,265,150; và Winter, G. (1994) “Making Antibodies By Phage Display Technology”, *Annu. Rev. Immunol.* 12.433-455).

Kháng thể hoặc protein được quan tâm có thể được giải trình tự bằng cách thoái biến Edman đã biết rõ với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Thông tin peptit thu được từ kỹ thuật đo phổ khối hoặc thoái biến Edman có thể được sử dụng để thiết kế mẫu dò hoặc đoạn môi được sử dụng để tách dòng protein được quan tâm.

Phương pháp tách dòng protein được quan tâm khác là “phân tích trọng lượng” bằng cách sử dụng B7-H3 được tinh chế hoặc các phần của nó để tế bào biểu hiện kháng thể hoặc protein được quan tâm. B7-H3 tồn tại ở dạng “2Ig” và dạng “4Ig”. Trình tự axit amin của dạng “2Ig” của B7-H3 của người là (SEQ ID NO:1):

|             |            |            |            |
|-------------|------------|------------|------------|
| MLRRRGSPGM  | GVHVGAALGA | LWFCLTGALE | VQVPEDPVVA |
| LVGTDATLCC  |            |            |            |
| SFSPEPGFSL  | AQLNLIWQLT | DTKQLVHSFA | EGQDQGSAYA |
| NRTALFPDLL  |            |            |            |
| AQGNASRLRLQ | RVRVADEGSF | TCFVSIRDFG | SAAVSLQVAA |
| PYSKPSMTLE  |            |            |            |
| PNKDLRPGDT  | VTITCSSYRG | YPEAEVFWQD | GQGVPLTGNV |
| TTSQMANEQG  |            |            |            |
| LFDVHSLRV   | VLGANGTYSC | LVRNPVLQQD | AHGSVTITGQ |
| PMTFPPEALW  |            |            |            |
| VTVGLSVCLI  | ALLVALAFVC | WRKIKQSCEE | ENAGAEDQDG |
| EGEGSKTALQ  |            |            |            |
| PLKHSDSKED  | DGQEIA     |            |            |

Trình tự cADN mã hoá dạng “2Ig” của B7-H3 của người là (SEQ ID NO:2):

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca

ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtgggtggca  
 ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg  
 gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct  
 gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg  
 gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc  
 acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgcccg tcagcctgca ggtggccgct  
 ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg  
 gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc tacctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat  
 gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc  
 ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc  
 ctggtgcgca acccctgct gcagcaggat ggcacaggct ctgtaccat cacagggcag  
 cctatgacat tccccccaga ggccctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt  
 gcactgctgg tggccctggc ttcgtgtgc tggagaaaga taaacagag ctgtgaggag  
 gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag  
 cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcc

Trình tự axit amin của dạng “2Ig” của B7-H3 của người (SEQ ID NO:1) (được  
 in đậm và gạch chân) được bao gồm hoàn toàn trong dạng “4Ig” của B7-H3 của người  
 (SEQ ID NO:76):

|                          |                          |                          |                   |
|--------------------------|--------------------------|--------------------------|-------------------|
| <b><u>MLRRRGSPGM</u></b> | <b><u>GVHVGAALGA</u></b> | <b><u>LWFCLTGALE</u></b> | <b>VQVPEDPVVA</b> |
| <b>LVGTDATLCC</b>        |                          |                          |                   |
| <b>SFSPEPGFSL</b>        | <b>AQLNLIWQLT</b>        | <b>DTKQLVHSFA</b>        | <b>EGQDQGSAYA</b> |
| <b>NRTALFPDLL</b>        |                          |                          |                   |
| <b>AQGNASLRLQ</b>        | <b>RVRVADEGSF</b>        | <b>TCFVSIRDFG</b>        | <b>SAAVSLQVAA</b> |
| <b>PYSKPSMTLE</b>        |                          |                          |                   |
| <b>PNKDLRPGDT</b>        | <b>VTITCSSYQG</b>        | <b>YPEAEVFWQD</b>        | <b>GQGVPLTGNV</b> |
| <b>TTSQMANEQG</b>        |                          |                          |                   |

LFDVHSILRV VLGANGTYSC LVRNPVLQQD AHSSVTITPQ  
 RSPTGAVEEVQ

VPEDPVVALV GTDATLRCSF SPEPGFSLAQ LNLIWQLTDT  
KQLVHSFTEG

RDQGSAYANR TALFPDLLAQ GNASLRLQRV RVADEGSFTC  
FVSIRDFGSA

AVSLQVAAPY SKPSMTLEPN KDLRPGDTVT ITCSSYRGYP  
EAEVFWQDGO

GVPLTGNTTT SQMANEQGLF DVHSVLRVVL GANGTYSCLV  
RNPVLQQDAH

GSVTITGQPM TFPPEALWVT VGLSVCLIAL LVALAFVCWR  
KIKQSCEEN

AGAEDQDGEG EGSKTALQPL KHSDSKEDDG QEIA

Trình tự cADN mã hoá dạng “4Ig” của B7-H3 của người là (SEQ ID NO:77);  
 gốc mã hoá dạng “2Ig” của B&-H3 được in đậm và gạch chân:

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca

ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtggtggca

ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg

gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct

gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg

gcacagggca acgcatccct gaggtgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc

acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccg tcagcctgca ggtggccgct

ccctactcga agcccagcat gacctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg

gtgaccatca cgtgtccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat

gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc

ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc

ctggtgcga acccctgtct gcagcaggat ggcacagct ctgtacat cacacccag  
 agaagcccca caggagccgt ggagggtccag gtccctgagg acccgggtgtt ggccctagt  
ggcaccgatg ccacctgcg ctgtctctt tccccgagc ctggcttcag cctggcacag  
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc  
cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcaca  
ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc  
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgt ggcgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac  
tgaagccca gcatgacct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc  
atcagtgct ccagctaccg gggctacct gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag  
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgtt  
gatgtgcaca gcgtctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctgggt  
cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg  
acattccccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggctgt ctgtctgtct cattgcactg  
ctgggtggccc tggtttctgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat  
gcaggagctg aggaccagga tggggaggga gaaggtcca agacagccct gcagcctctg  
aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cc

Quy trình “phân tích trọng lượng” có thể được tiến hành bằng cách thu thư viện cADN từ các mô hoặc tế bào biểu hiện B7-H3, biểu hiện quá mức cADN trong loại tế bào thứ hai và sàng lọc tế bào được chuyển nhiễm của loại tế bào thứ hai để liên kết đặc hiệu với B7-H3. Mô tả chi tiết về các phương pháp được sử dụng trong tách dòng gen của động vật có vú mã hoá protein bề mặt tế bào bằng cách “phân tích trọng lượng” có thể được tìm thấy trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem Aruffo, A. et al. (1987) “Molecular Cloning Of A CD28 cDNA By A High-Efficiency COS Cell Expression System”, Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 84:8573-8577 and Stephan, J. et al. (1999) “Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation”, Endocrinol. 140:5841-5854).

cADN mã hoá kháng thể kháng B7-H3 và chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến peptit B7-H3 khác có thể thu được bằng cách phiên mã ngược mARN loại tế bào cụ thể bằng các phương pháp chuẩn trong lĩnh vực kỹ thuật này. Cụ thể, mARN có thể được phân lập bằng cách sử dụng các enzym ly giải hoặc các dung dịch hoá học khác nhau theo các quy trình nêu trong tài liệu Sambrook et al. Supra hoặc được chiết tác bởi nhựa liên kết axit nucleic có trên thị trường dựa trên các hướng dẫn kèm theo được cung cấp bởi nhà sản xuất (ví dụ, Qiagen, Invitrogen, Promega). Sau đó, cADN đã tổng hợp được đưa vào vector biểu hiện để tạo ra kháng thể hoặc protein được quan tâm ở tế bào thuộc loại thứ hai. Hàm ý là vector biểu hiện phải sao chép được ở tế bào chủ hoặc là thể bổ sung hoặc là một phần thiết yếu của ADN nhiễm sắc thể. Vector biểu hiện thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, plasmit, vector virus, bao gồm adenovirus, virus kết hợp adeno, retrovirus và cosmid.

Vector chứa polynucleotit được quan tâm có thể được đưa vào tế bào chủ bằng nhiều cách thích hợp, bao gồm điện di, chuyển nhiễm sử dụng canxi clorua, rubidi clorua, canxi phosphat, DEAE-dextran hoặc các chất khác; bắn vi đạn; chuyển gen bằng liposom; và lây nhiễm (ví dụ, trong đó vector là tác nhân truyền nhiễm như virus vaccine). Lựa chọn đưa vào vector hoặc polynucleotit sẽ thường phụ thuộc vào đặc tính của tế bào chủ.

Tế bào chủ bất kỳ có khả năng biểu hiện quá mức ADN khác loại có thể được sử dụng nhằm mục đích phân lập gen mã hoá kháng thể, polypeptit hoặc protein được quan tâm. Ví dụ không giới hạn về tế bào chủ của động vật có vú thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào COS, HeLa và CHO. Tốt hơn nếu tế bào chủ biểu hiện cADN ở mức cao hơn khoảng 5 lần, tốt hơn nữa là cao hơn 10 lần, thậm chí tốt hơn nữa là cao hơn 20 lần so với kháng thể hoặc protein nội sinh được quan tâm tương ứng, nếu có mặt, ở tế bào chủ. Việc sàng lọc tế bào chủ để liên kết đặc hiệu với B7-H3 được thực hiện bằng thử nghiệm miễn dịch hoặc FACS. Tế bào biểu hiện quá mức kháng thể hoặc protein được quan tâm có thể được nhận dạng.

Các kỹ thuật khác nhau cũng có sẵn có thể được sử dụng để tạo ra chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến peptit B7-H3 đột biến mã hoá cho việc bổ sung, xoá hoặc thay đổi trình tự axit amin của protein thu được so với chất chủ vận, chất đối

kháng hoặc tác nhân điều biến phân tử peptit B7-H3 gốc.

Sáng chế bao gồm các polypeptit gồm trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế. Polypeptit theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Polypeptit có thể được tạo ra bằng cách phân giải protein hoặc phương pháp thoái biến khác đối với kháng thể, bằng các phương pháp tái tổ hợp (tức là polypeptit đơn hoặc polypeptit dung hợp) như được nêu ở trên hoặc bằng cách tổng hợp hoá học. Các polypeptit của kháng thể, đặc biệt là polypeptit ngắn hơn có chứa khoảng 50 axit amin, được tạo ra thuận lợi bằng cách tổng hợp hoá học. Các phương pháp tổng hợp hoá học là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và có trên thị trường. Ví dụ, polypeptit kháng B7-H3 có thể được tạo ra bởi thiết bị tổng hợp polypeptit tự động sử dụng phương pháp pha rắn.

#### IV. Các phương pháp sàng lọc polypeptit và kháng thể đơn dòng

Một số phương pháp có thể được sử dụng để sàng lọc polypeptit và kháng thể đơn dòng mà liên kết với B7-H3. Cần hiểu rằng “liên kết” chỉ liên kết đặc hiệu liên quan về sinh học hoặc miễn dịch, và không chỉ liên kết đặc hiệu có thể xảy ra, ví dụ, khi globulin miễn dịch được sử dụng ở nồng độ rất cao đối với đích không đặc hiệu. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng được sàng lọc để liên kết với B7-H3 bằng cách sử dụng các kỹ thuật sàng lọc chuẩn. Theo cách này, thu được kháng thể đơn dòng kháng B7-H3. Tế bào lai được ưu tiên theo sáng chế là tế bào lai tạo ra kháng thể BRCA69D, BRCA84D hoặc PRCA157.

Kháng thể đơn dòng bổ sung liên kết với B7-H3 có thể được nhận dạng. Nhằm mục đích này, các kháng thể đơn dòng được sàng lọc về khả năng phân biệt của chúng có thể liên kết với mô ung thư mà không liên kết với tế bào không ung thư. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng mà liên kết với B7-H3 và cũng phản ứng chéo với tế bào hoặc mô ung thư của người, mà không phải với tế bào hoặc mô thường ở mức độ tương tự, được chọn. Một phương pháp có thể được sử dụng để sàng lọc là hoá mô miễn dịch (IHC). Kỹ thuật hoá mô miễn dịch chuẩn là đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, xem ANIMAL CELL CULTURE METHODS (J.P. Mather and D. Barnes, eds., Academic Press, NY, Vol. 57, Ch. 18 and 19, pp. 314-350, 1998). Các mẫu sinh học (ví dụ, các mô) có thể thu được từ sinh thiết, mổ tử thi hoặc

mô xác. Để khẳng định rằng B7-H3 chỉ có mặt ở tế bào ung thư, kháng thể kháng B7-H3 có thể được sử dụng để phát hiện sự có mặt của B7-H3 ở các mô từ cá thể mắc bệnh ung thư trong khi các mô không ung thư từ cá thể mắc bệnh ung thư hoặc các mô từ cá thể không mắc bệnh ung thư khác được sử dụng làm mẫu đối chứng. Mô có thể được nhúng trong nền rắn hoặc bán rắn để ngăn ngừa sự tổn hại trong quá trình đông lạnh (ví dụ, gel agarosa hoặc OCT) và sau đó được phân chia để nhuộm. Bệnh ung thư từ các cơ quan khác nhau và thuộc các phân hạng khác nhau có thể được sử dụng để sàng lọc kháng thể đơn dòng. Ví dụ về các mô mà có thể được sử dụng nhằm mục đích sàng lọc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, buồng trứng, vú, phổi, tuyến tiền liệt, ruột kết, thận, da, tuyến giáp, não, tim, gan, dạ dày, thần kinh, mạch máu, xương, ống tiêu hoá trên và tụy. Ví dụ về các loại bệnh ung thư loại khác nhau mà có thể được sử dụng nhằm mục đích sàng lọc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, caxinom, ung thư tuyến, sacom, bệnh ung thư tuyến, u bạch huyết và bệnh bạch cầu.

Theo một phương án ưu tiên khác, các dòng tế bào ung thư như HMEC (BioWhittaker CC- 2251), HUVEC (tế bào nội mô sơ cấp), BT-474 (ATCC# HTB-20), MCF7 (ATCC# HTB22), MDA-MB-175-VII (ATCC# HB-25), MDA-MB-361 (ATCC# HB-27), SKBR3 (ATCC# HTB-30), A549 (ATCC# CCL- 185), Calu-3 (ATCC# HTB-55), SKMES-I (ATCC# HTB-58), ES-2 (ATCC# CRL-1978), SKOV3 (ATCC# HTB- 77), Panc-1 (ATCC# CRL-1469), AsPC-I (ATCC# CRL-1682), HPAF-II (ATCC# CRL-1997), Hs700T (ATCC# HTB-174), Colo205 (ATCC# CCL-222), HT-29 (ATCC# HTB-38), SW480 (ATCC# CCL-228), SW948 (ATCC# CCL- 237), 293 (ATCC # CRL-1573), 786-O (ATCC# CRL-1932), A498 (ATCC# HTB-44), Caki-2 (ATCC# HTB-47), COS-7 (ATCC# CRL-1651), RL-65 (ATCC # CRL-10345), SV-T2 (ATCC# CCL-163.1), 22RV1 (ATCC# CRL-2505), DU145 (ATCC# HTB-81), LNCaP (ATCC# CRL-1740), PC-3 (ATCC# CRL-1435), HT29 (ATCC# HTB-38), Hs746T (ATCC# HTB-135), NCI-N87 (ATCC# CRL-5822) và tế bào thường từ mô tương ứng của tế bào này có thể được sử dụng để sàng lọc kháng thể đơn dòng đặc hiệu đối với mô ung thư. Giống cây tế bào sơ cấp, hoặc độ cấy chuyển thấp, thu được từ mô thường từ các cơ quan khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở, thận, buồng trứng, vú, phổi, tuyến tiền liệt, ruột kết, thận, da, tuyến giáp, cơ trơn động mạch chủ và tế bào nội mô có thể được sử dụng làm đối chứng âm. Tế bào ung thư hoặc không ung thư có

thể được nuôi trên lam kính hoặc lá kính đáy, hoặc trên các bề mặt nhựa, hoặc được điều chế trong thiết bị CellArray™, như được nêu trong tài liệu WO 01/43869 và được sàng lọc về khả năng liên kết kháng thể bằng cách sử dụng IHC như được nêu ở trên đối với các mô. Theo cách khác, tế bào có thể được loại bỏ khỏi bề mặt sinh trưởng bằng cách sử dụng phương pháp không phân giải protein và quay tròn thành viên, sau đó được nhúng và được xử lý như mô để phân tích IHC như được nêu ở trên. Tế bào có thể được cấy vào cơ thể động vật bị suy giảm miễn dịch, khối u được phép phát triển và sau đó khối u này có thể được thu hoạch, được nhúng và được dùng làm nguồn mô để phân tích IHC. Theo một phương án khác, tế bào đơn có thể được sàng lọc bằng cách ủ với kháng thể sơ cấp, kháng thể “chỉ thị” bậc hai được liên kết với phân tử huỳnh quang và sau đó được phân tích bằng cách sử dụng máy phân loại tế bào được hoạt hoá huỳnh quang (FACS).

Bất kỳ trong số các hệ thống phát hiện khác nhau có thể được sử dụng để phát hiện việc liên kết kháng thể với lát mô. Thông thường, hoá mô miễn dịch bao gồm bước liên kết kháng thể sơ cấp với mô và sau đó kháng thể bậc hai phản ứng với loài thu được từ kháng thể sơ cấp này được tạo ra và được tiếp hợp với chất đánh dấu phát hiện được (ví dụ, peroxidaza cây cải ngựa HRP, hoặc diaminobenzedin DAB). Một phương pháp khác có thể được sử dụng là kháng thể bổ sung ảnh phản chiếu đa dòng hay polyMICA™ (polyclonal Mirror Image Complementary Antibodies; The Binding Site Limited, Birmingham, UK; Mangham, D.C. et al. (1999) “A Novel Immunohistochemical Detection System Using Mirror Image Complementary Antibodies (MICA)”, Histopathology 35(2):129-33). Kỹ thuật PolyMICA™ có thể được sử dụng để thử nghiệm việc liên kết kháng thể sơ cấp (ví dụ, kháng thể kháng B7-H3) với mô thường và mô ung thư. Các loại kit phát hiện polyMICA™ có trên thị trường: Sản phẩm số HK004.D là kit phát hiện polyMICA™ sử dụng chất phản ứng màu DAB; Sản phẩm số HK004.A là kit phát hiện polyMICA™ sử dụng chất phản ứng màu AEC. Theo cách khác, kháng thể sơ cấp có thể được đánh dấu trực tiếp bằng chất đánh dấu phát hiện được.

Bước thứ nhất trong quy trình sàng lọc IHC để lựa chọn kháng thể thích hợp là quá trình liên kết kháng thể bậc một được gia tăng trong chuột nhất (ví dụ, kháng thể



kháng B7-H3) với một hoặc nhiều tác nhân sinh miễn dịch (ví dụ, các mẫu tế bào hoặc mẫu mô). Theo một phương án, mẫu mô là lát cắt mô đông lạnh từ các cơ quan khác nhau. Các mẫu tế bào hoặc mẫu mô có thể là dạng ung thư hoặc không ung thư.

Các mô đông lạnh có thể được chuẩn bị, được cắt lát, được cố định hoặc không và quy trình IHC được thực hiện bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu Stephan et al. (1999) "Distribution and Function Of The Adhesion Molecule BEN During Rat Development", Dev. Biol. 212:264-277 and Stepchan et al. (1999) "Selective Cloning Of Cell Surface Proteins Involved In Organ Development: Epithelial Glycoprotein Is Involved In Normal Epithelial Differentiation", Endocrinology 140:5841-5854).

#### V. Các phương pháp mô tả đặc điểm của kháng thể kháng B7-H3

Phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp có thể được sử dụng để đặc trưng hóa kháng thể kháng B7-H3. Một phương pháp là nhận diện epitop mà nó liên kết với. Quy trình lập biểu đồ epitop có sẵn trên thị trường từ các nguồn khác nhau, ví dụ, Pepscan Systems (Lelystad, Hà Lan). Quy trình lập biểu đồ epitop có thể được sử dụng để xác định trình tự mà kháng thể kháng B7-H3 liên kết với. Epitop này có thể là epitop dạng thẳng, tức là có trong một đoạn axit amin đơn, hoặc epitop cấu hình được tạo thành bởi tương tác ba chiều của các axit amin mà có thể không nhất thiết có trong đoạn đơn.

Các peptit có độ dài khác nhau (ví dụ, tốt hơn là ít nhất từ 4 đến 6 axit amin) có thể được phân lập hoặc được tổng hợp (ví dụ, theo cách tái tổ hợp) và được sử dụng cho thử nghiệm liên kết với kháng thể kháng B7-H3. Epitop mà kháng thể kháng B7-H3 liên kết có thể được xác định trong sàng lọc hệ thống bằng cách sử dụng peptit trùng lặp thu được từ trình tự ngoại bào và xác nhận sự liên kết bởi kháng thể kháng B7-H3.

Một phương pháp khác mà có thể được sử dụng để mô tả kháng thể kháng B7-H3 là sử dụng thử nghiệm cạnh tranh với kháng thể đã biết khác mà liên kết với cùng một kháng nguyên, tức là B7-H3 để xác định nếu kháng thể kháng B7-H3 liên kết với cùng một epitop như kháng thể khác. Ví dụ về kháng thể đối với B7-H3 có sẵn trên thị trường có thể hữu dụng và có thể được nhận dạng bằng cách sử dụng thử nghiệm liên kết được mô tả ở đây. Thử nghiệm cạnh tranh là đã biết với người có hiểu biết trung

bình về lĩnh vực kỹ thuật này và các quy trình và số liệu minh họa được mô tả chi tiết trong phần Ví dụ. Kháng thể kháng B7-H3 có thể còn đặc trưng ở các mô, loại ung thư hoặc loại khối u mà chúng liên kết.

Một phương pháp mô tả kháng thể kháng B7-H3 khác là sử dụng kháng nguyên mà nó liên kết. Kháng thể kháng B7-H3 được sử dụng trong kỹ thuật thẩm tách Westen bằng các dịch thủy phân tế bào từ các bệnh ung thư khác nhau ở người. Như đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, kỹ thuật thẩm tách Westen bao gồm bước chạy dịch thủy phân tế bào và/hoặc các phân đoạn tế bào trên gel biến tính hoặc không biến tính, chuyển các protein lên giấy nitroxenluloza và sau đó dò điểm thẩm tách bằng với kháng thể (ví dụ, kháng thể kháng B7-H3) để tìm ra các protein bị hạn chế bởi kháng thể. B7-H3 liên quan đến các bệnh ung thư khác nhau ở các mô khác nhau của người bao gồm, nhưng không giới hạn ở ruột kết, vú, buồng trứng, tụy và phổi.

#### VI. Các phương pháp chẩn đoán ung thư bằng cách sử dụng kháng thể kháng B7-H3 và các tác nhân điều biến B7-H3

Kháng thể đơn dòng đối với B7-H3 tạo ra bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả có thể được sử dụng để nhận biết sự có mặt hoặc không có mặt của tế bào ung thư trong nhiều mô, bao gồm nhưng không giới hạn ở, buồng trứng, vú, phổi, tuyến tiền liệt, ruột kết, thận, tụy, da, tuyến giáp, não, tim, gan, dạ dày, thần kinh, mạch máu, xương và ống tiêu hóa trên, nhằm mục đích chẩn đoán. Kháng thể đơn dòng đối với B7-H3 được tạo ra bằng các phương pháp được mô tả trong bản mô tả cũng có thể được sử dụng để nhận biết sự có mặt hoặc không có mặt của tế bào ung thư, hoặc hàm lượng của chúng, mà tuần hoàn trong máu sau khi chúng được giải phóng khỏi khối u rắn. Kháng nguyên tuần hoàn này có thể là kháng nguyên B7-H3 nguyên vẹn, hoặc mảnh kháng thể mà vẫn giữ được khả năng là được phát hiện bằng các phương pháp được mô tả ở đây. Việc phát hiện này có thể được thực hiện bằng phân tích FACS bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc sử dụng này có thể bao gồm việc tạo thành phức hợp giữa B7-H3 và kháng thể mà liên kết đặc hiệu với B7-H3. Ví dụ về các kháng thể này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 được tạo ra bởi tế bào lai BRCA84D, BRCA69D và PRCA157. Sự tạo thành các phức hợp này có thể là in vitro hoặc in vivo.

Không bị giới hạn bởi lý thuyết bất kỳ, kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 có thể liên kết với B7-H3 qua miền ngoại bào của B7-H3 và sau đó có thể được thu nhận.

Theo một phương pháp chẩn đoán được ưu tiên của sáng chế, kháng thể mang chất đánh dấu phát hiện được. Ví dụ về các chất đánh dấu có thể được sử dụng bao gồm chất phóng xạ hoặc chất huỳnh quang, như phycoerythrin hoặc isothioxyanat fluorescein (còn được biết đến là floisothioxyanat hoặc FITC).

Như đối với các kháng thể đã biết khác được sử dụng trên thị trường cho mục đích chẩn đoán và trị liệu, thì kháng nguyên đích theo sáng chế này được biểu hiện rộng rãi trong các mô thường. Nó cũng được điều hòa tăng ở một số khối u. Do vậy, liều lượng và đường phân phối kháng thể cụ thể theo sáng chế khi được dùng cho chẩn đoán hoặc trị liệu sẽ được thiết kế cho tình trạng khối u hoặc bệnh cụ thể, cũng như cho cá thể cụ thể đang được điều trị.

Một phương pháp sử dụng kháng thể để chẩn đoán là chụp hình khối u in vivo bằng cách liên kết kháng thể này với chất có hoạt tính phóng xạ hoặc chất cản bức xạ, cho cá thể đó dùng kháng thể và sử dụng máy chụp hình tia x hoặc máy chụp hình khác để quan sát vị trí của kháng thể được đánh dấu trên bề mặt của các tế bào ung thư biểu hiện kháng nguyên. Kháng thể này được cho dùng ở nồng độ có khả năng thúc đẩy sự liên kết trong các điều kiện sinh lý.

Kỹ thuật in vitro để phát hiện ra B7-H3 là kỹ thuật thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym (ELISA), thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch enzym (EIA), thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA), và thử nghiệm thẩm tách Westen.

Theo một khía cạnh của sáng chế, các phương pháp chụp hình phóng xạ khối u hoặc ung thư, hoặc xác định độ hiệu nghiệm của phương pháp điều trị bằng kháng thể được đánh dấu phóng xạ, bao gồm bước cho cá thể dùng kháng thể đặc hiệu khối u được đánh dấu phóng xạ theo thực tiễn sáng chế. Kháng thể được đánh dấu phóng xạ có thể là kháng thể đơn dòng hoặc kháng thể đa dòng chứa chất đánh dấu phóng xạ, tốt hơn nếu được chọn từ nhóm bao gồm Techneti-99m, indi-111, Iot-131, Reni-186, Reni-188, Samari-153, Luteti-177, đồng-64, Scandi-47, Yttri-90. Kháng thể đơn dòng được đánh dấu bằng các nhân xạ trị như Iot-131, Reni-188, Holmi-166, Samari-153 và Scandi-47,

mà không ảnh hưởng đến hoạt tính miễn dịch của kháng thể và không bị phá hủy in vivo, là đặc biệt được ưu tiên. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này sẽ hiểu được rằng các chất đồng vị phóng xạ khác là đã biết và có thể thích hợp cho các ứng dụng cụ thể. Việc chụp hình phóng xạ có thể được tiến hành bằng cách sử dụng phương pháp chụp cắt lớp photon đơn (SPECT), kỹ thuật chụp cắt lớp phát xạ positron (PET), chụp cắt lớp vi tính (CT) hoặc chụp cộng hưởng từ (MRI). Việc chụp hình đối xạ, mà cho phép xác định ảnh giải phẫu lớn hơn của vị trí di căn định vị bởi phương pháp chụp hình miễn dịch phóng xạ, cũng được bao gồm trong bản mô tả.

Theo các phương pháp khác, các tế bào ung thư được loại bỏ và mô được chuẩn bị để phân tích hoá mô miễn dịch bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, nhúng trong hợp chất đông lạnh, làm đông lạnh và cắt lát, có cố định hoặc không; cố định và nhúng trong parafin bằng phương pháp phục hồi và phản chất nhuộm kháng nguyên hoặc không). Kháng thể đơn dòng cũng có thể được sử dụng để nhận biết tế bào ung thư ở giai đoạn phát triển khác nhau. Kháng thể cũng có thể được sử dụng để xác định khối u của cá thể có sự biểu hiện kháng nguyên trên bề mặt của chúng ở mức độ định trước và từ đó là ứng viên cho liệu pháp miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể được định hướng kháng kháng nguyên. Kháng thể này có thể nhận dạng cả ung thư nguyên phát và ung thư di căn có biểu hiện B7-H3. Như được sử dụng trong bản mô tả này, sự phát hiện có thể bao gồm cả sự phát hiện định tính và/hoặc định lượng và có thể bao gồm việc so sánh mức đo được đối với tế bào bình thường với mức tăng biểu hiện B7-H3 ở các tế bào ung thư.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp hỗ trợ chẩn đoán ung thư đặc trưng ở chỗ tế bào ung thư này biểu hiện B7-H3 ở cá thể bằng cách sử dụng kháng thể bất kỳ mà liên kết với B7-H3 và các phương pháp bất kỳ khác mà có thể được sử dụng để xác định mức độ biểu hiện B7-H3. Như được sử dụng trong bản mô tả này, các phương pháp “hỗ trợ chẩn đoán” nghĩa là các phương pháp này hỗ trợ việc xác định về sự phân loại, hoặc bản chất của ung thư ở mức lâm sàng và có thể ảnh hưởng hoặc không ảnh hưởng đến việc chẩn đoán cuối cùng. Do đó, phương pháp hỗ trợ chẩn đoán ung thư có thể gồm bước phát hiện nồng độ của B7-H3 trong mẫu sinh học từ cá thể và/hoặc xác định mức độ biểu hiện B7-H3 trong mẫu này. Kháng thể nhận dạng kháng nguyên hoặc một phần

của kháng nguyên cũng có thể được sử dụng để xây dựng các thử nghiệm miễn dịch chẩn đoán để phát hiện ra kháng nguyên được giải phóng hoặc được tiết từ các tế bào ung thư đang sống hoặc chết trong dịch thể, bao gồm nhưng không giới hạn ở, máu, nước bọt, nước tiểu, dịch phổi, hoặc dịch cổ trướng.

Không phải tất cả các tế bào trong một khối u cụ thể đang quan tâm sẽ đều biểu hiện B7-H3 và các tế bào ung thư ở các mô khác cũng có thể biểu hiện B7-H3, như vậy cá thể cần được sàng lọc sự có mặt hoặc không có mặt của B7-H3 trên các tế bào ung thư để xác định tính hữu dụng của liệu pháp miễn dịch ở cá thể. Kháng thể kháng B7-H3 tạo ra bằng các phương pháp được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng để xác định liệu cá thể được chẩn đoán mắc bệnh ung thư có thể được cho là ứng viên cho liệu pháp miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể được định hướng kháng B7-H3. Theo một phương án, khối u ung thư hoặc mẫu sinh thiết có thể được thử nghiệm về sự biểu hiện B7-H3, bằng cách sử dụng kháng thể được định hướng kháng B7-H3. Các cá thể có tế bào ung thư biểu hiện B7-H3 là các ứng viên thích hợp cho liệu pháp miễn dịch bằng cách sử dụng kháng thể được định hướng kháng B7-H3. Kỹ thuật nhuộm bằng kháng thể kháng B7-H3 cũng có thể được sử dụng để phân biệt các mô ung thư với các mô bình thường.

Các phương pháp sử dụng kháng thể kháng B7-H3 nhằm mục đích chẩn đoán là hữu hiệu cả trước và sau hình thức điều trị chống ung thư bất kỳ, ví dụ, hoá trị hoặc xạ trị, để xác định khối u nào có khả năng đáp ứng nhất với việc điều trị được đưa ra, việc tiên lượng cá thể mắc ung thư, kiểu phụ khối u hoặc nguồn gốc của bệnh di căn và sự tiến triển bệnh hoặc đáp ứng với việc điều trị.

Chế phẩm theo sáng chế cũng thích hợp để chẩn đoán các tình trạng bệnh khác ngoài bệnh ung thư, bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả chung ở trên trong các ứng dụng với các tế bào mắc bệnh khác (không phải ung thư). Các tình trạng bệnh thích hợp để sử dụng theo các phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bệnh hoặc rối loạn liên quan đến đáp ứng viêm hoặc đáp ứng tự miễn trong cá thể. Các phương pháp được mô tả ở trên có thể được sử dụng để điều tiết các đáp ứng viêm hoặc đáp ứng tự miễn ở cá thể. Các bệnh và các tình trạng bệnh lý do rối loạn viêm và rối loạn tự miễn mà có thể được chẩn đoán và/hoặc điều trị bằng cách sử dụng

chế phẩm và các phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhằm mục đích minh họa chứ không nhằm mục đích giới hạn, bệnh đa xơ cứng, bệnh viêm màng não, bệnh viêm não, đột quỵ, các chấn thương não khác, bệnh viêm ruột bao gồm bệnh viêm ruột kết mạn loét và bệnh Crohn, bệnh nhược cơ năng, bệnh luput ban đỏ, bệnh viêm đa khớp dạng thấp, bệnh hen, bệnh đái đường cấp khởi phát ở độ tuổi vị thành niên, bệnh sa sút trí tuệ do AIDS, bệnh xơ vữa động mạch, bệnh viêm thận, bệnh viêm võng mạc, bệnh viêm da cơ địa, bệnh vẩy nến, bệnh thiếu máu cục bộ cơ tim và tổn thương phổi cấp do bạch cầu.

Các chỉ định khác nữa để sử dụng trong chẩn đoán và/hoặc trị liệu của kháng thể và các chất trị liệu khác theo sáng chế bao gồm việc sử dụng cho các cá thể có nguy cơ đào thải cơ quan hoặc mô ghép. Trong những năm gần đây, đã có tiến bộ đáng kể về hiệu quả của các kỹ thuật phẫu thuật để cấy mô và cơ quan như da, thận, gan, tim, phổi, tụy và tủy xương. Có lẽ vấn đề tồn tại chính là chưa có chất thích hợp để kích thích sự dung nạp miễn dịch đối với mô ghép cùng loài hoặc cơ quan được cấy ở đối tượng nhận. Khi các tế bào hoặc cơ quan dị sinh được cấy vào vật chủ (tức là đối tượng cho và đối tượng nhận là các cá thể khác nhau trong cùng một loài), thì hệ miễn dịch của vật chủ có thể tạo ra đáp ứng miễn dịch đối với các kháng nguyên lạ trong mô cấy (bệnh vật chủ chống lại mảnh cấy) dẫn đến việc phá hủy mô đã được cấy.

Việc sử dụng được mô tả ở bất kỳ đâu trong bản mô tả này đối với kháng thể kháng B7-H3 còn bao gồm việc sử dụng chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến B7- H3 khác như được mô tả ở đây. Theo các phương án này, chất chủ vận, chất đối kháng hoặc tác nhân điều biến phi kháng thể khác được thay thế cho kháng thể B7-H3 trong các bước đã được mô tả và các biến đổi nằm trong phạm vi hiểu biết của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này được thực hiện để xây dựng được phương pháp cho chế phẩm điều biến B7-H3 được thay thế.

Kháng thể đơn dòng đối với B7-H3 tạo ra bằng các phương pháp được bộc lộ ở đây có thể được sử dụng để nhận biết sự có mặt hoặc không có mặt của tế bào gốc ung thư người ở các mô khác nhau. Các tế bào gốc ung thư (CSCs) được giả thuyết là có vai trò trong sự sinh trưởng và di căn của khối u (Ghotra, V.P. et al. (2009) "The Cancer Stem Cell Microenvironment And Anti-Cancer Therapy", Int. J. Radiat. Biol.

85(11):955-962; Gupta, P.B. et al. (2009) "Cancer Stem Cells: Mirage Or Reality?" Nat. Med. 15(9):1010-1012; Lawson, J.C. et al. (2009) "Cancer Stem Cells In Breast Cancer And Metastasis", Breast Cancer Res. Treat. 118(2):241-254; Hermann, P.C. et al. (2009) "Pancreatic Cancer Stem Cells--Insights And Perspectives", Expert Opin. Biol. Ther. 9(10):1271-1278; Schatton, T. et al. (2009) "Identification And Targeting Of Cancer Stem Cells", Bioessays 31(10):1038-1049; Mittal, S. et al. (2009) "Cancer Stem Cells: The Other Face Of Janus", Amer. J. Med. Sci. 338(2):107-112; Alison, M.R. et al. (2009) "Stem Cells And Lung Cancer: Future Therapeutic Targets?" Expert Opin. Biol. Ther. 9(9):1127-1141; Charafe-Jauffret, E. et al. (2009) "Breast Cancer Stem Cells: Tools And Models To Rely On", BMC Cancer 9:202; Scopelliti, A. et al. (2009) "Therapeutic Implications Of Cancer Initiating Cells", Expert Opin. Biol. Ther. 9(8):1005-1016; Công bố PCT WO 2008/091908). Theo giả thuyết này, các CSC tạo ra một tập hợp con nhỏ và khác biệt gồm các tế bào trong mỗi khối u mà có khả năng tự tái sinh không giới hạn và phát triển thành (các) tế bào u trưởng thành hơn bị hạn chế tương đối về khả năng sao chép. Giả sử rằng các tế bào gốc ung thư này có thể có tính kháng nhiều hơn đối với các chất hoá trị, các điều kiện phóng xạ hoặc gây độc khác và như vậy, chống chịu được sau các liệu pháp lâm sàng và sau đó phát triển thành các khối u thứ cấp, di căn hoặc là nguyên nhân gây tái phát. Đã gợi ý rằng CSC có thể bắt nguồn từ các tế bào gốc mô bình thường hoặc từ các tế bào gốc mô được biệt hoá hơn.

Các tế bào gốc ung thư ở người có một vài đặc tính xác định. Các đặc tính này được mô tả trong công bố đơn PCT số WO 2008/091908 và được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn. Kháng thể đơn dòng đối với các đích trên bề mặt tế bào gốc ung thư có thể được sử dụng để nhận biết sự có mặt hoặc không có mặt của tế bào gốc ung thư trong nhiều mô khác nhau. Kháng thể đơn dòng đối với B7-H3 tạo ra bằng các phương pháp được bộc lộ ở đây cũng có thể được sử dụng để nhận biết sự có mặt hoặc không có mặt của các tế bào gốc ung thư, hoặc nồng độ của các tế bào gốc ung thư trong mẫu hoặc mô hoặc trong hệ tuần hoàn sau khi chúng được giải phóng từ khối u rắn. Kháng nguyên tuần hoàn này có thể là kháng nguyên B7-H3 nguyên vẹn, hoặc mảnh kháng thể mà vẫn giữ được khả năng là được phát hiện bằng các phương pháp được mô tả ở đây. Việc phát hiện này có thể được thực hiện bằng phân tích FACS bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này. Theo

một phương án khác, sự phát hiện này có thể bị ảnh hưởng bởi phân tích mẫu mô bằng hoá mô miễn dịch bằng cách sử dụng các phương pháp chuẩn thường được sử dụng trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Việc sử dụng này có thể bao gồm việc tạo phức hợp giữa B7-H3 và kháng thể mà liên kết đặc hiệu với B7-H3 trên các tế bào gốc ung thư. Ví dụ về các kháng thể này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 được tạo ra bởi các tế bào lai BRCA84D, BRCA69D và PRCA157. Việc tạo các phức hợp này có thể là in vitro hoặc in vivo.

Việc sử dụng được mô tả trong đơn này mà mô tả việc sử dụng chúng cho các kháng thể kháng B7-H3 cũng bao gồm việc sử dụng chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến B7-H3 khác như được mô tả ở đây để sử dụng trong nhận diện và điều trị các tế bào gốc ung thư. Theo các phương án này, kháng thể kháng B7-H3 và các chất chủ vận, chất đối kháng và tác nhân điều biến B7-H3 khác được sử dụng để nhận diện, chẩn đoán hoặc điều trị trị liệu các tế bào gốc ung thư bằng các phương pháp tương tự đã được mô tả và các biến đổi nằm trong phạm vi hiểu biết của người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này để xây dựng được phương pháp nhận diện/chẩn đoán hoặc điều trị các tế bào gốc ung thư.

## VII. Chế phẩm được ưu tiên theo sáng chế

Sáng chế bao gồm chế phẩm, bao gồm dược phẩm, chứa kháng thể kháng B7-H3, các polypeptit thu được từ kháng thể kháng B7-H3, polynucleotit gồm trình tự mã hoá kháng thể kháng B7-H3 và các chất khác như được mô tả ở đây. Như được sử dụng trong bản mô tả này, chế phẩm còn chứa một hoặc nhiều kháng thể, các polypeptit và/hoặc các protein mà liên kết với B7-H3, chất chủ vận, chất đối kháng, các tác nhân điều biến B7-H3 và/hoặc một hoặc nhiều polynucleotit gồm trình tự mã hoá một hoặc nhiều kháng thể, các polypeptit và các protein liên kết với B7-H3.

Sáng chế còn đề cập đến thể tiếp hợp của chất chủ vận, chất đối kháng hoặc tác nhân điều biến peptit B7-H3 bất kỳ và các cấu trúc hoá học bổ sung mà hỗ trợ cho một hoặc nhiều chức năng được dự định của chất chủ vận, chất đối kháng hoặc tác nhân điều biến peptit B7-H3 cụ thể.



Các thể tiếp hợp này bao gồm chất chủ vận, chất đối kháng hoặc tác nhân điều biến peptit B7-H3 được liên kết cộng hoá trị với đại phân tử như cơ chất giá thể rắn, không tan được sử dụng trong các quy trình chẩn đoán, sàng lọc hoặc tinh chế được mô tả ở đây. Các nguyên liệu cơ chất thích hợp bao gồm chất nền bất kỳ trơ về mặt hoá học, có độ xốp cao và có số lượng lớn các nhóm chức có khả năng tạo liên kết cộng hoá trị với các phối tử peptit. Các ví dụ về nguyên liệu cơ chất và các phương pháp để tạo ra thể tiếp hợp cơ chất-phối tử được mô tả trong tài liệu Dean et al. (Eds) AFFINITY CHROMATOGRAPHY: A PRACTICAL APPROACH, IRL Press (1985); Lowe, "An Introduction to Affinity Chromatography", trong Work et al. (eds) LABORATORY TECHNIQUES IN BIOCHEMISTRY AND MOLECULAR BIOLOGY, Vol. 7, Part II, North-Holland (1979); Porath et al., "Biospecific Affinity Chromatography", trong Neurath, H. et al. (eds), THE PROTEINS, 3rd ed., Vol. 1, pp. 95-178 (1975); và Schott, H. AFFINITY CHROMATOGRAPHY, Macel Dekker, Inc. NY (1984).

Sáng chế cũng đề cập đến thể tiếp hợp của chất chủ vận, chất đối kháng hoặc tác nhân điều biến peptit B7-H3 và gốc chỉ thị bất kỳ được sử dụng trong các quy trình chẩn đoán được mô tả ở đây. Chất chủ vận, chất đối kháng hoặc tác nhân điều biến peptit B7-H3, các polypeptit và các protein theo sáng chế, bao gồm kháng thể kháng B7-H3, còn được nhận dạng và đặc trưng hóa bởi (một hoặc nhiều) tiêu chuẩn sau đây:

- (a) khả năng liên kết đặc hiệu với B7-H3 (và cụ thể là phân tử B7-H3 được biểu hiện trên các bề mặt của các tế bào ung thư, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tế bào ung thư thận, tuyến tiền liệt, hoặc phổi);
- (b) khả năng ức chế cạnh tranh sự liên kết ưu tiên của kháng thể kháng B7-H3 đã biết với B7-H3, bao gồm khả năng liên kết ưu tiên với cùng một epitop B7-H3 mà kháng thể gốc ưu tiên liên kết với;
- (c) khả năng liên kết với một phần của B7-H3 mà lộ ra trên bề mặt của tế bào sống *in vitro* hoặc *in vivo*;
- (d) khả năng liên kết với một phần của B7-H3 mà lộ ra trên bề mặt của tế bào ung thư đang sống biểu hiện B7-H3;
- (e) khả năng phân phối chất hoá trị đến các tế bào ung thư (như tế bào ung

thư thận, tuyến tiền liệt, hoặc phổi) biểu hiện B7-H3 trên bề mặt tế bào;  
và/hoặc

- (f) khả năng phân phối chất trị liệu hoặc chỉ thị để phát hiện đến tế bào ung thư (như nhưng không giới hạn ở tế bào ung thư tuyến tiền liệt) biểu hiện B7-H3 trên bề mặt tế bào.

Kháng thể được ưu tiên theo sáng chế sẽ biểu hiện mức nhuộm IHC biệt hóa đối với mô khối u so với các mô bình thường không ung thư và hơn nữa còn có khả năng thử nghiệm về hiệu quả của kháng thể ở các mô hình linh trưởng (và đặc biệt là khỉ đuôi dài). Kháng thể được ưu tiên theo sáng chế cũng biểu hiện mức ái lực và độ đặc hiệu kháng nguyên mong muốn. Kháng thể được ưu tiên theo sáng chế cũng biểu hiện mức hoạt tính điều biến miễn dịch và sự thu nhận tế bào mong muốn.

Theo một số phương án, kháng thể theo sáng chế là kháng thể được tạo ra bởi các tế bào lai BRCA84D, BRCA69D, hoặc PRCA157, hoặc thế hệ con của chúng. Sáng chế còn bao gồm nhiều chế phẩm kháng thể khác nhau được tạo ra bởi các tế bào lai được lưu giữ này và các kháng thể tương đương hoặc các mảnh polypeptit (ví dụ, Fab, Fab', F(ab')<sub>2</sub> Fv, Fc, v.v.), kháng thể thể khảm, chuỗi đơn (scFv), các thể đột biến của chúng, các protein dung hợp gồm một phần kháng thể, kháng thể được biến đổi giống như của người và cấu hình được biến đổi khác của kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này hoặc các kháng thể tương đương chứa kháng nguyên (B7-H3), vị trí nhận dạng độ đặc hiệu được yêu cầu. Sáng chế cũng đề cập đến kháng thể người biểu hiện một hoặc nhiều đặc tính sinh học của thành viên họ kháng thể kháng B7-H3. Kháng thể tương đương của họ kháng thể kháng B7-H3 (bao gồm kháng thể được biến đổi giống như của người và kháng thể người), các mảnh polypeptit và các polypeptit gồm mảnh bất kỳ trong số các mảnh này được nhận diện và đặc trưng hóa bằng (một hoặc nhiều) tiêu chuẩn bất kỳ trong năm tiêu chuẩn được mô tả ở trên. Các trình tự trong miền biến đổi chuột và được biến đổi giống như của người lấy làm ví dụ của kháng thể kháng B7-H3 được nêu trong công bố đơn PCT số WO 2008/066691. Các trình tự này được nêu nhằm mục đích minh họa chứ không nhằm mục đích giới hạn và các trình tự khác nhau cũng như các mảnh và biến thể của các trình tự được nêu này, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế.

BRCA84D, BRCA69D và PRCA157 là kháng thể B7-H3 được ưu tiên của sáng chế do profin IHC trong mô bình thường sạch hơn của chúng, sự biệt hóa IHC khối u/bình thường mạnh hơn, liên kết từ trung bình đến mạnh (BIACORE™)/IHC), độ phản ứng chéo với B7-H3 của khi đuôi dài và hoạt tính tiềm năng đối với phân tử DART™ (“UDART™”) thông thường so với các kháng thể còn lại. Theo một phương án cụ thể được ưu tiên, sáng chế bao gồm biến thể thể khảm và được biến đổi giống như của người của các kháng thể được ưu tiên này, cũng như biến thể tự nhiên và thể khảm và được biến đổi giống như của người của các kháng thể được ưu tiên này mà có các vùng Fc biến đổi như được mô tả dưới đây. Sáng chế còn bao gồm phân tử DART™ có vùng liên kết epitop của kháng thể này, đặc biệt là liên quan đến (các) vùng liên kết epitop liên kết với thụ thể tế bào T, thụ thể NKG2D, hoặc kháng nguyên liên quan đến khối u hoặc kháng nguyên không hoàn toàn như chất fluorescein (ví dụ, isothioxyanat fluorescein (còn được biết là floisothioxyanat hoặc FITC)).

Theo một số phương án, các kháng thể, các polypeptit và các protein theo sáng chế mà liên kết với B7-H3 là các kháng thể, các polypeptit và các protein ức chế cạnh tranh liên kết ưu tiên của kháng thể kháng B7-H3 mô tả ở đây với B7-H3. Theo một số phương án, các kháng thể, các polypeptit và các protein ưu tiên liên kết với cùng một epitop trên B7-H3 khi kháng thể kháng B7-H3 của chuột ưu tiên liên kết.

Do đó, sáng chế đề cập đến sản phẩm bất kỳ sau đây (chế phẩm, bao gồm được phẩm, gồm dạng bất kỳ trong số các dạng sau đây): (a) kháng thể được tạo ra bởi tế bào chủ với số lưu giữ được nhận diện ở trên hoặc thể hệ con của chúng; (b) dạng được biến đổi giống như của người của kháng thể này; (c) kháng thể chứa một hoặc nhiều vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể này; (d) kháng thể thể khảm gồm vùng biến đổi tương đồng hoặc thu được từ vùng biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể này và vùng hằng định tương đồng hoặc thu được từ vùng hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể người; (e) kháng thể chứa một hoặc nhiều CDR chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng (ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu) của kháng thể này; (f) kháng thể chứa chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể này; (g) kháng thể người tương đương với kháng thể này. Dạng được biến đổi giống như của người của kháng thể này có thể có hoặc có thể không có CDR giống hệt với kháng thể gốc, hoặc

kháng thể được tạo ra bởi tế bào chủ có số lưu giữ được nhận diện ở trên. Việc xác định các vùng CDR là dễ dàng đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này. Theo một số phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể chứa ít nhất một CDR mà về cơ bản là tương đồng với ít nhất một CDR, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất 5 CDR của kháng thể được tạo ra bởi một trong các tế bào lai được lưu giữ nhận diện ở trên (hoặc theo một số phương án về cơ bản là tương đồng với tất cả 6 CDR của một trong các kháng thể này, hoặc thu được từ một trong các kháng thể này), hoặc kháng thể được tạo ra bởi tế bào chủ với số lưu giữ được nhận diện ở trên. Các phương án khác bao gồm kháng thể có ít nhất hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu CDR mà về cơ bản là tương đồng với ít nhất hai, ba, bốn, năm hoặc sáu CDR của kháng thể được tạo ra từ tế bào lai được lưu giữ như được nhận diện ở đây, hoặc thu được từ kháng thể này. Cần hiểu rằng, với mục đích của sáng chế, độ đặc hiệu liên kết và/hoặc hoạt tính tổng thể (mà có thể là về phân phối chất hoá trị đến hoặc vào các tế bào ung thư để làm giảm sự sinh trưởng và/hoặc tăng sinh của các tế bào ung thư, để cảm ứng quá trình chết theo chương trình ở tế bào ung thư, để trì hoãn sự tiến triển di căn và/hoặc điều trị giảm đau) thường được giữ lại, mặc dù mức độ hoạt tính có thể thay đổi so với kháng thể được tạo ra bởi tế bào lai được lưu giữ (có thể là mạnh hơn hoặc yếu hơn). Sáng chế còn đề cập đến các phương pháp để tạo ra kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này. Các phương pháp tạo ra kháng thể là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được mô tả ở đây.

Sáng chế còn đề cập đến các polypeptit gồm trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế. Theo một số phương án, polypeptit gồm một hoặc nhiều vùng biến đổi chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể. Theo một số phương án, polypeptit gồm một hoặc nhiều CDR chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể. Theo một số phương án, polypeptit gồm ba CDR của chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể. Theo một số phương án, polypeptit gồm trình tự axit amin của kháng thể có đặc điểm bất kỳ trong số các đặc điểm sau đây: ít nhất 5 axit amin liên tục trong trình tự của kháng thể ban đầu, ít nhất 8 axit amin liên tục, ít nhất khoảng 10 axit amin liên tục, ít nhất khoảng 15 axit amin liên tục, ít nhất khoảng 20 axit amin liên tục, ít nhất khoảng 25 axit amin liên tục, ít nhất khoảng 30 axit amin liên tục, trong đó ít nhất 3 trong số các axit amin là từ vùng biến đổi của kháng thể. Theo một phương án, vùng biến đổi là từ chuỗi nhẹ của kháng thể gốc. Theo một phương án khác, vùng biến đổi là từ chuỗi nặng của kháng

thể. Theo một phương án khác, 5 (hoặc hơn 5) axit amin liên tục là từ vùng quyết định tính bổ sung (CDR) của kháng thể.

Theo một số phương án của sáng chế, tế bào theo sáng chế biểu hiện B7-H3, một phần của B7-H3, kháng thể kháng B7-H3 hoặc các polypeptit liên kết với B7-H3 khác theo sáng chế được dùng trực tiếp cho cá thể để điều biến hoạt tính sinh học của B7-H3 *in vivo*.

Kháng thể kháng B7-H3 được ưu tiên theo sáng chế là BRCA84D, BRCA69D và PRCA157, tất cả các kháng thể này là kháng thể chuột có phản ứng với phân tử B7-H3 của người. Trình tự axit amin và trình tự polynucleotit mã hoá của chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D, BRCA69D và PRCA157 được thể hiện bên dưới cùng với các miền CDR<sub>1</sub>, CDR<sub>2</sub> và CDR<sub>3</sub> của mỗi chuỗi này. Người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này có thể xây dựng được kháng thể có các CDR này, cũng như các dẫn xuất của kháng thể này, có khả năng liên kết với epitop được nhận dạng bởi BRCA84D, BRCA69D và PRCA157.

#### A. Các trình tự của BRCA84D

##### (1) Trình tự chuỗi nhẹ của BRCA84D

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D (SEQ ID NO:3):

```
DIAMTQSQKF   MSTSVGDRVS   VTCKASQNVD   TNVAWYQQKP
GQSPKALIYS

ASYRYSGVDP   RFTGSGSGTD   FTLTINNVQS   EDLAEYFCQQ
YNNYPFTFGS

GTKLEIK
```

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D (SEQ ID NO:4):

```
gacattgcga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc
gtcacctgca aggccagtc gaattgtgat actaatgtag cctggtatca acagaaacca
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtcctgat
```

cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcagtct  
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg

gggacaaaagt tggaaataaa a

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D CDR1 (SEQ ID NO:5): KASQNVDTNVA

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D CDR1 (SEQ ID NO:6): aaggccagtc agaattgtgga tactaatgta gcc

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D CDR2 (SEQ ID NO:7): SASYRYS

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D CDR2 (SEQ ID NO:8): tcggcatcct accggtacag t

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D CDR3 (SEQ ID NO:9): QQYNNYPFT

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D CDR3 (SEQ ID NO:10): cagcaatata acaactatcc attcacg

(2) Trình tự chuỗi nặng của BRCA84D

Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D (SEQ ID NO:11):

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA  
PEKGLEWVAY

ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNLTF LQMTSLRSED  
TAMYYCGRGR

ENIYYGSRLD YWGQGTTTLTV SS

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D (SEQ ID NO:12):

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaactc  
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct  
ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatatc attagtagtg acagtagtgc catctactat  
gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atccaagaa caccctgttc  
ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgttg aagagggagg

gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc  
tcctca

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D CDR1 (SEQ ID NO:13): FGMH

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D CDR1 (SEQ ID NO:14): tttggaatgcac

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D CDR2 (SEQ ID NO:15):  
YISSDSSAIYYADTVK

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D CDR2 (SEQ ID NO:16): tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D CDR3 (SEQ ID NO:17):  
GRENIYYGSRLDY

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D CDR3 (SEQ ID NO:18): gggagggaaa acattacta cggtagtagg cttgactac

## B. Các trình tự của BRCA69D

### (1) Trình tự chuỗi nhẹ của BRCA69D

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA69D (SEQ ID NO:19):

DIQMTQTTSS      LSASLGDRVT      ISCRASQDIS      NYLNWYQQKP  
DGTVKLLIYY  
TSRLHSGVPS      RFSGSGSGTD      YSLTIDNLEQ      EDIATYFCQQ  
GNTLPPTFGG  
GTKLEIK

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA69D (SEQ ID NO:20):

gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc  
atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaacca  
gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcacgat tacactcagg agtcccatca

agggttcagtgc gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattgacaa cctggagcaa  
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttctccgac gttcgggtgga  
ggcaccaaac tggaaatcaa a

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA69D CDR1 (SEQ ID NO:21): RASQDISNYLN

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA69D CDR1 (SEQ ID NO:22): agggcaagtc aggacattag taattattta aac

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA69D CDR2 (SEQ ID NO:23): YTSRLHS

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA69D CDR2 (SEQ ID NO:24): tacacatcac gattacactc a

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA69D CDR3 (SEQ ID NO:25): QQGNTLPPT

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA69D CDR3 (SEQ ID NO:26): caacagggtatacgttcc tccgacg

(2) Trình tự chuỗi nặng của BRCA69D

Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi của BRCA69D (SEQ ID NO:27):

QVQLQQSGAE LARPGASVKL SCKASGYTFT SYWMQWVKQR  
PGQGLEWIGT

IYPGDGDTRY TQKFKGKATL TADKSSSTAY MQLSSLASED  
SAVYYCARRG

IPRLWYFDVW GAGTTVTVSS

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA69D (SEQ ID NO:28):

caggttcagc tccagcagtc tggggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaagttg  
tcttgcaagg cttctggcta cacctttact agctactgga tgcagtgggt aaaacagagg  
cctggacagg gtctggaatg gattgggact attatcctg gagatgggtga tactaggtac  
actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac  
atgcaactca gcagcttggc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagaggg



attccacggc ttggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggcac cgtctctca

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA69D CDR1 (SEQ ID NO:29): SYWMQ

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA69D CDR1 (SEQ ID NO:30): agctactgga tgcag

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA69D CDR2 (SEQ ID NO:31): TIYPGDGDTR  
YTQKFKG

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA69D CDR2 (SEQ ID NO:32): actatttata ctggagatgg tgatactagg tacactcag aagtcaagg gc

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA69D CDR3 (SEQ ID NO:33): RGIPRLWYFD  
V

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA69D CDR3 (SEQ ID NO:34): agaggattc cacggcttg gtacttcgat gtc

### C. Các trình tự của PRCA157

#### (1) Trình tự chuỗi nhẹ của PRCA157

Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi của PRCA157 (SEQ ID NO:35):

DIQMTQSPAS    LSVSVGETVT    ITCRASESIY    SYLAWYQQKQ  
GKSPQLLVYN  
TKTLPEGVPS    RFSGSGSGTQ    FSLKINSLQP    EDFGRYYCQH  
HYGTPPWTFG  
GGTNLEIK

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của PRCA157 (SEQ ID NO:36):

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga  
aactgtcacc attacatgtc gagcaagtga gagtatttac agttatttag  
catggatatca gcagaaacag ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat  
acaaaaacct taccagaggg tgtgccatca aggttcagtg gcagtggatc

aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct gaagattttg  
ggagatatta ctgtcaacat cattatggta ctctccgtg gacgttcggt

ggaggcacca acctggaaat caaa

Chuỗi nhẹ biến đổi của PRCA157 CDR1 (SEQ ID NO:37): RASESIYSYLA

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của PRCA157 CDR1 (SEQ ID NO:38): cgagcaagtg agagtattta cagttattta gca

Chuỗi nhẹ biến đổi của PRCA157 CDR2 (SEQ ID NO:39): NTKTLPE

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của PRCA157 CDR2 (SEQ ID NO:40): aatacaaaaa ccttaccaga g

Chuỗi nhẹ biến đổi của PRCA157 CDR3 (SEQ ID NO:41): QHHYGTTPW

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của PRCA157 CDR3 (SEQ ID NO:42): caacatcatt atggtactcc tccgtgg

(2) Trình tự chuỗi nặng của PRCA157

Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi của PRCA157 (SEQ ID NO:43):

EVQQVESGGD LVKPGGSLKL SCAASGFTFS SYGMSWVRQT  
PDKRLEWVAT

INSGGSNTYY PDSLKGRFTI SRDNAKNTLY LQMRSCLKSED  
TAMYYCARHD

GGAMDYWGQG TSVTVSS

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của PRCA157 (SEQ ID NO:44):

gaggtgcagc aggtggagtc ggggggagac ttagtgaagc ctggagggtc  
cctgaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt tcctatggca  
tgtcttgggt tcgccagact ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc  
attaatagtg gtggaagtaa cacctactat ccagacagtt tgaaggggcg  
attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctttac ctgcaaatgc

gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgac

gggggagcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc a

Chuỗi nặng biến đổi của PRCA157 CDR1 (SEQ ID NO:45): SYGMS

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của PRCA157 CDR1 (SEQ ID NO:46): tcctatggca tgtct

Chuỗi nặng biến đổi của PRCA157 CDR2 (SEQ ID NO:47): VATINSGGSN  
TYYPDSLKG

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của PRCA157 CDR2 (SEQ ID NO:48): gtcgcaacca ttaatagtgg tggaagtaac acctactatc cagacagttt gaagggg

Chuỗi nặng biến đổi của PRCA157 CDR3 (SEQ ID NO:49): HDGGAMDY

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của PRCA157 CDR3 (SEQ ID NO:50): catgacgggg gagctatgga ctac

#### D. Kháng thể B7-H3 được xử lý Fc

Trong chức năng miễn dịch thông thường, tương tác giữa phức hợp kháng thể-kháng nguyên với tế bào của hệ miễn dịch tạo ra chuỗi đáp ứng lớn, bao gồm từ chức năng tác động như gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể, khử hạt tế bào mast và thực bào đối với các tín hiệu điều biến miễn dịch như điều hoà quá trình tăng sinh lymphô bào và tiết kháng thể. Tất cả các tương tác này được khởi phát thông qua việc liên kết miễn Fc của kháng thể hoặc phức hợp miễn dịch với thụ thể bề mặt tế bào được đặc hiệu trên các tế bào tạo huyết. Tính đa dạng của các đáp ứng tế bào được khởi động bởi kháng thể và phức hợp miễn dịch do tính không đồng nhất về cấu trúc của ba thụ thể Fc: FcγRI (CD64), FcγRII (CD32), và FcγRIII (CD16). FcγRI (CD64), FcγRIIA (CD32A) và FcγRIII (CD16) là các thụ thể hoạt hoá (tức là tăng cường hệ miễn dịch); FcγRIIB (CD32B) là thụ thể ức chế (tức là làm yếu hệ miễn dịch). Trình tự axit amin của vùng Fc của IgG1 được thể hiện dưới đây (như SEQ ID NO:51, được đánh số theo tài liệu Kabat et al., SEQUENCE OF PROTEINS OF IMMUNOLOGICAL INTEREST, 5<sup>th</sup> Ed. Tài liệu Public Health Service, NIH, MD (1991), được đưa vào riêng đây bằng cách viện dẫn và từ đây được gọi là “Kabat EU”):

SEQ ID NO: 51

|                     |            |            |            |
|---------------------|------------|------------|------------|
| PAPELLGGPS          | VFLFPPKPKD | TLNISRTPEV | TCVVVDVSHE |
| DPEVKFNWYV          |            |            |            |
| 230                 | 240        | 250        | 260 270    |
| DGVEVHNAKT          | KPREEQYNST | YRVVSVLTVL | HQDWLNGKEY |
| KCKVSNKALP          |            |            |            |
| 280                 | 290        | 300        | 310 320    |
| APIEKTISKA          | KGQPREPQVY | TLPPSREEMT | KNQVSLTCLV |
| KGFYPSDIAV          |            |            |            |
| 330                 | 340        | 350        | 360 370    |
| EWESNGQPEN          | NYKTTTPVLD | SDGSFFLYSK | LTVDKSRWQQ |
| GNVFSCSVMH          |            |            |            |
| 380                 | 390        | 400        | 410 420    |
| EALHNHYTQK SLSLSPGK |            |            |            |
| 430                 | 440        |            |            |

Các gốc 230-341 là vùng Fc CH2. Các gốc 342-447 là vùng Fc CH3.

Sáng chế bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 chứa vùng Fc biến thể có một hoặc nhiều biến đổi axit amin (ví dụ, thay thế, làm khuyết, cài xen) trong một hoặc nhiều phần, mà biến đổi này tăng ái lực và tổng ái lực của vùng Fc biến thể đối với FcγR (bao gồm các FcγR hoạt hoá và ức chế). Theo một số phương án, một hoặc nhiều biến đổi axit amin làm tăng ái lực của vùng Fc biến thể với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA. Theo một phương án khác, vùng Fc biến thể còn liên kết đặc hiệu với FcγRIIB với ái lực nhỏ hơn so với vùng Fc của kháng thể gốc tương đương (tức là kháng thể có trình tự axit amin giống như kháng thể theo sáng chế chỉ khác một hoặc nhiều biến đổi axit amin trong vùng Fc). Theo một số phương án, các biến đổi này làm tăng ái lực của vùng Fc biến thể đối với FcγRIIIA và/hoặc FcγRIIA và còn tăng cường ái lực của vùng Fc biến thể với FcγRIIB so với kháng thể gốc. Theo các phương án khác, một hoặc nhiều biến đổi axit amin này làm tăng ái lực của vùng Fc biến thể đối với FcγRIIIA

và/hoặc FcγRIIA nhưng không thay đổi ái lực của vùng Fc biến thể đối với FcγRIIB so với vùng Fc của kháng thể gốc. Theo một phương án khác, một hoặc nhiều biến đổi axit amin này làm tăng cường ái lực của vùng Fc biến thể đối với FcγRIIA và FcγRIIA nhưng giảm ái lực đối với FcγRIIB so với kháng thể gốc. Ái lực và/hoặc tổng ái lực được tăng lên dẫn đến sự liên kết dễ phát hiện với FcγR hoặc hoạt tính liên quan đến FcγR ở tế bào biểu hiện nồng độ thấp của FcγR khi hoạt tính liên kết của phân tử gốc (mà không có vùng Fc được biến đổi) không thể được phát hiện ở tế bào. Theo cách phương án khác, phân tử được biến đổi có liên kết dễ phát hiện ở tế bào mà biểu hiện kháng nguyên đích của thụ thể phi FcγR ở tỷ trọng nằm trong khoảng từ 30.000 đến 20.000 phân tử/tế bào”, ở tỷ trọng nằm trong khoảng từ 20.000 đến 10.000 phân tử/tế bào”, ở tỷ trọng nằm trong khoảng từ 10.000 đến 5.000 phân tử/tế bào”, ở tỷ trọng nằm trong khoảng từ 5.000 đến 1.000 phân tử/tế bào”, ở tỷ trọng nằm trong khoảng từ 1.000 đến 200 phân tử/tế bào” hoặc ở tỷ trọng bằng 200 phân tử/tế bào” hoặc ít hơn (nhưng ít nhất là 10, 50, 100 hoặc 150 phân tử/tế bào”).

Theo một phương án khác, một hoặc nhiều biến đổi đối với các axit amin của vùng Fc làm giảm ái lực và tổng ái lực của kháng thể đối với một hoặc nhiều thụ thể FcγR. Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao gồm kháng thể chứa vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể gồm ít nhất một biến đổi axit amin so với vùng Fc kiểu đại, vùng Fc biến thể này chỉ liên kết với một FcγR, trong đó FcγR này là FcγRIIA. Theo phương án khác cụ thể, sáng chế bao gồm kháng thể chứa vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này gồm ít nhất một biến đổi axit amin so với vùng Fc kiểu đại, vùng Fc biến thể này chỉ liên kết với một FcγR, trong đó FcγR này là FcγRIIA.

Tốt hơn nếu đặc tính liên kết của phân tử theo của sáng chế được đặc trưng bởi thử nghiệm chức năng in vitro để xác định một hoặc nhiều chức năng tế bào tác động của chất môi giới FcγR (xem phần 5.2.7). Ái lực và đặc tính liên kết của các phân tử, ví dụ, kháng thể, theo sáng chế đối với FcγR có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm in vitro (thử nghiệm dựa trên sinh hoá hoặc miễn dịch) đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này để xác định tương tác kháng thể-kháng nguyên hoặc Fc-FcγR, tức là sự liên kết đặc hiệu của kháng nguyên với kháng thể hoặc liên kết đặc hiệu của vùng Fc với FcγR, một cách tương ứng, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, thử nghiệm ELISA,

thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt, thử nghiệm kết tủa miễn dịch. Theo các phương án được ưu tiên nhất, phân tử theo sáng chế có các đặc tính liên kết tương tự như trong mô hình in vivo (như các đặc tính được mô tả và được bộc lộ ở đây) như trong các thử nghiệm gốc in vitro. Tuy nhiên, sáng chế không loại trừ các phân tử theo sáng chế mà không biểu hiện kiểu hình mong muốn trong thử nghiệm gốc in vitro mà biểu hiện kiểu hình mong muốn in vivo.

Theo một số phương án, phân tử theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể gồm ít nhất một biến đổi axit amin (ví dụ, có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc nhiều hơn 9 biến đổi axit amin) ở miền CH3 của vùng Fc, mà được xác định là kéo dài từ axit amin 342 đến axit amin 447. Theo các phương án khác, phân tử theo sáng chế bao gồm vùng Fc biến thể gồm ít nhất một biến đổi axit amin (ví dụ, có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc nhiều hơn 9 biến đổi axit amin) ở miền CH2 của vùng Fc, mà được xác định là kéo dài từ axit amin 231 đến axit amin 341. Theo một số phương án, phân tử theo sáng chế bao gồm ít nhất hai biến đổi axit amin (ví dụ, có 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc nhiều hơn 9 biến đổi axit amin), trong đó ít nhất một biến đổi này là ở vùng CH3 và ít nhất một biến đổi là ở vùng CH2. Sáng chế còn bao gồm biến đổi axit amin trong vùng khớp nối. Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao gồm biến đổi axit amin ở miền CH1 của vùng Fc, mà được xác định là kéo dài từ axit amin 216 đến axit amin 230.

Theo một phương án đặc biệt ưu tiên, sáng chế bao gồm phân tử gồm vùng Fc biến thể trong đó biến thể này mang hoặc có hoạt tính ADCC gia tăng và/hoặc liên kết với Fc $\gamma$ RIIA (CD32A) gia tăng, như được xác định bằng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và được lấy làm ví dụ trong bản mô tả. Thử nghiệm ADCC được sử dụng theo các phương pháp của sáng chế có thể là phụ thuộc vào NK hoặc phụ thuộc vào đại thực bào.

Theo các phương án đặc biệt ưu tiên, sáng chế bao gồm phân tử gồm vùng Fc biến thể trong đó biến thể này mang hoặc có hoạt tính ADCC gia tăng và/hoặc liên kết với Fc $\gamma$ RIIIA (CD16A) gia tăng, khi được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này và được lấy làm ví dụ trong bản mô tả. Thử nghiệm ADCC được sử dụng theo các phương pháp của sáng chế có thể là phụ thuộc vào NK hoặc phụ thuộc vào đại thực bào.

Biến thể Fc theo sáng chế có thể được kết hợp với các biến đổi Fc khác, như các biến thể được nêu trong các Patent Mỹ số 7,632,497; 7,521,542; 7,425,619; 7,416,727; 7,371,826; 7,355,008; 7,335,742; 7,332,581; 7,183,387; 7,122,637; và 6,737,056; trong công bố đơn PCT số WO 2008/105886; WO 2008/002933; WO 2007/021841; WO 2007/106707; WO 06/088494; WO 05/115452; WO 05/110474; WO 04/1032269; và trong WO 04/063351; và trong tài liệu Presta, L.G. et al. (2002) “Engineering therapeutic antibodies for improved function”, *Biochem. Chem. Soc. Trans.* 30(4):487-490; Shields, R.L. et al. (2002) “Lack of fucose on human IgG1 N-linked oligosaccharide improves binding to human FcγRIII and antibody-dependent cellular toxicity”, *J. Biol. Chem.* 26;277(30):26733-26740 và Shields, R.L. et al. (2001) “High resolution mapping of the binding site on human IgG1 for Fc gamma RI, Fc gamma RII, Fc gamma RIII, and FcRn and design of IgG1 variants with improved binding to the Fc gamma R”, *J. Chem. Ther.* 276(9):6591-6604). Sáng chế bao gồm sự kết hợp biến thể Fc theo sáng chế với các biến đổi Fc khác để tạo ra các tính chất cộng, hiệp đồng, hoặc mới cho kháng thể biến đổi. Tốt hơn nữa, biến thể Fc theo sáng chế làm tăng cường kiểu hình của biến đổi mà chúng được kết hợp. Ví dụ, nếu biến thể Fc theo sáng chế được kết hợp với thể đột biến đã biết để liên kết FcγRIIIA với ái lực cao hơn so với vùng Fc kiểu đại tương đương; thì sự kết hợp với thể đột biến theo sáng chế làm gia tăng ái lực FcγRIIIA lên gấp nhiều lần.

Sáng chế bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 mà chứa vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này gồm ít nhất một biến đổi axit amin (ví dụ, có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc nhiều hơn 9 biến đổi axit amin) so với vùng Fc kiểu đại, sao cho phân tử này có chức năng tác động tăng cường so với phân tử chứa vùng Fc kiểu đại, với điều kiện vùng Fc biến thể không có đột biến thay thế hoặc chỉ có đột biến thay thế ở một hoặc nhiều vị trí trong số 243, 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438, 439. Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao gồm kháng thể chứa vùng Fc biến thể như vậy, trong đó vùng Fc biến thể này gồm ít nhất một biến đổi axit amin (ví dụ, có 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc nhiều hơn 9 biến đổi axit amin) so với vùng Fc kiểu đại, sao cho phân tử này liên kết với FcγR có

ái lực đã được biến đổi so với phân tử chứa vùng Fc kiểu đại, với điều kiện vùng Fc biến thể này không có đột biến thay thế hoặc chỉ có đột biến thay thế ở một hoặc nhiều vị trí bất kỳ trong số 243, 255, 258, 267, 269, 270, 276, 278, 280, 283, 285, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 300, 303, 305, 307, 309, 320, 322, 329, 332, 331, 337, 338, 340, 373, 376, 416, 419, 434, 435, 437, 438, 439 và không có alanin ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí 256, 290, 298, 312, 326, 333, 334, 359, 360, hoặc 430; asparagin ở vị trí 268; glutamin ở vị trí 272; glutamin, serin, hoặc axit aspartic ở vị trí 286; serin ở vị trí 290; metionin ở vị trí 301; metionin, glutamin, axit glutamic, hoặc arginin ở vị trí 320; axit glutamic ở vị trí 322; asparagin, serin, axit glutamic, hoặc axit aspartic ở vị trí 326; lysin ở vị trí 330; glutamin ở vị trí 334; axit glutamic ở vị trí 334; metionin ở vị trí 334; histidin ở vị trí 334; valin ở vị trí 334; leuxin ở vị trí 334; glutamin ở vị trí 335; lysin ở vị trí 335; hoặc threonin ở vị trí 339.

Sáng chế cũng bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 mà chứa vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này gồm kháng thể chứa vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này không có đột biến thay thế hoặc chỉ có đột biến thay thế ở một hoặc nhiều vị trí bất kỳ trong số 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 320, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439 và không có histidin, glutamin, hoặc tyrosin ở vị trí 280; serin, glyxin, threonin hoặc tyrosin ở vị trí 290, asparagin ở vị trí 294, lysin ở vị trí 295; prolin ở vị trí 296; prolin, asparagin, axit aspartic, hoặc valin ở vị trí 298; hoặc leuxin hoặc Isoleuxin ở vị trí 300. Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm kháng thể chứa vùng Fc biến thể này, trong đó vùng Fc biến thể này gồm ít nhất một biến đổi axit amin so với vùng Fc kiểu đại, sao cho phân tử này liên kết với Fc $\square$ R với ái lực giảm so với phân tử gồm vùng Fc kiểu đại, với điều kiện vùng Fc biến thể này không có đột biến thay thế hoặc chỉ có đột biến thay thế ở một hoặc nhiều vị trí bất kỳ trong số 243, 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, hoặc 439. Theo một phương án khác nữa, sáng chế bao gồm kháng thể chứa vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này gồm ít nhất một biến đổi axit amin so với vùng Fc kiểu đại, sao cho phân tử này liên kết Fc $\square$ R với ái lực tăng cường so với phân tử gồm vùng Fc kiểu đại, với điều kiện vùng Fc biến thể không có



đột biến thay thế hoặc chỉ có đột biến thay thế ở một hoặc nhiều vị trí bất kỳ trong số 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398, hoặc 430.

Sáng chế còn bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 chứa vùng Fc biến thể, trong đó vùng Fc biến thể này không có đột biến thay thế hoặc chỉ có đột biến thay thế ở một hoặc nhiều vị trí bất kỳ trong số 330, 243, 247, 298, 241, 240, 244, 263, 262, 235, 269, hoặc 328 và không có leuxin ở vị trí 243, asparagin ở vị trí 298, leuxin ở vị trí 241 và isoleuxin hoặc alanin ở vị trí 240, histidin ở vị trí 244, valin ở vị trí 330, hoặc isoleuxin ở vị trí 328.

Sáng chế đặc biệt gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 mà chứa vùng Fc biến thể có chức năng tác động tăng cường và/hoặc ái lực biến đổi để hoạt hoá và/hoặc chất ức chế thụ thể, trong đó vùng Fc biến thể này gồm: (a) 1, 2, 3, 4, 5, hoặc 6 đột biến thay thế sau đây: S239D, S298A, A330L, I332E, E333A, hoặc K334A; hoặc (b) tổ hợp bất kỳ của các đột biến thay thế: (1) S298A, E333A và K334A; (2) S239D và I332E; hoặc (3) S239D, A330L và I332E.

Sáng chế đặc biệt bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 chứa vùng Fc biến thể với chức năng tác động tăng cường và/hoặc ái lực biến đổi để hoạt hoá và/hoặc ức chế thụ thể, trong đó vùng Fc biến thể này gồm đột biến thay thế:

- (1) ở vị trí 288 bằng asparagin, ở vị trí 330 bằng serin và ở vị trí 396 bằng leuxin;
- (2) ở vị trí 334 bằng axit glutamic, ở vị trí 359 bằng asparagin và ở vị trí 366 bằng serin;
- (3) ở vị trí 316 bằng axit aspartic, ở vị trí 378 bằng valin và ở vị trí 399 bằng axit glutamic;
- (4) ở vị trí 247 bằng leuxin và đột biến thể ở vị trí 421 bằng lysin;
- (5) ở vị trí 392 bằng threonin và ở vị trí 396 bằng leuxin;
- (6) ở vị trí 221 bằng axit glutamic, ở vị trí 270 bằng axit glutamic, ở vị trí 308 bằng alanin, ở vị trí 311 bằng histidin, ở vị trí 396 bằng leuxin và ở vị trí 402 bằng axit aspartic;

- (7) ở vị trí 419 bằng histidin và đột biến thế ở vị trí 396 bằng leuxin;
- (8) ở vị trí 240 bằng alanin và ở vị trí 396 bằng leuxin;
- (9) ở vị trí 410 bằng histidin và ở vị trí 396 bằng leuxin;
- (10) ở vị trí 243 bằng leuxin, ở vị trí 305 bằng isoleuxin, ở vị trí 378 bằng axit aspartic axit, ở vị trí 404 bằng serin và ở vị trí 396 bằng leuxin;
- (11) ở vị trí 255 với isoleuxin và ở vị trí 396 bằng leuxin;
- (12) ở vị trí 370 bằng axit glutamic và ở vị trí 396 bằng leuxin;
- (13) ở vị trí 270 bằng axit glutamic;

hoặc

- (14) tổ hợp bất kỳ của các đột biến thay thế từ (1) đến (12) nêu trên.

Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 chứa vùng Fc biến thể chứa đột biến thay thế: F243L, R292P và Y300L. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 chứa vùng Fc biến thể có chứa đột biến thay thế: L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L. Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 chứa vùng Fc biến thể có đột biến thay thế F243L, R292P, Y300L, V305I và P396L.

Theo một phương án cụ thể khác, sáng chế bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 chứa vùng Fc biến thể có đột biến thay thế ở vị trí 396 bằng leuxin, ở vị trí 270 bằng axit glutamic và ở vị trí 243 bằng leuxin. Theo một phương án cụ thể khác, phân tử này còn bao gồm một hoặc nhiều biến đổi axit amin như được mô tả ở đây.

Sáng chế đặc biệt bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 mà chứa vùng Fc biến thể với chức năng tác động tăng cường và/hoặc ái lực biến đổi để hoạt hoá và/hoặc ức chế tự thể, có biến đổi axit amin ở một hoặc nhiều vị trí sau đây: 119, 125, 132, 133, 141, 142, 147, 149, 162, 166, 185, 192, 202, 205, 210, 214, 215, 216, 217, 218, 219, 221, 222, 223, 224, 225, 227, 229, 231, 232, 233, 235, 240, 241, 242, 243, 244, 246, 247, 248, 250, 251, 252, 253, 254, 255, 256, 258, 261, 262, 263, 268, 269, 270, 272, 274, 275, 276, 279, 280, 281, 282, 284, 287, 288, 289, 290, 291, 292, 293,

295, 298, 301, 303, 304, 305, 306, 307, 308, 309, 310, 311, 312, 313, 315, 316, 317, 318, 319, 320, 323, 326, 327, 328, 330, 333, 334, 335, 337, 339, 340, 343, 344, 345, 347, 348, 352, 353, 354, 355, 358, 359, 360, 361, 362, 365, 366, 367, 369, 370, 371, 372, 375, 377, 378, 379, 380, 381, 382, 383, 384, 385, 386, 387, 388, 389, 390, 392, 393, 394, 395, 396, 397, 398, 399, 400, 401, 402, 404, 406, 407, 408, 409, 410, 411, 412, 414, 415, 416, 417, 419, 420, 421, 422, 423, 424, 427, 428, 431, 433, 435, 436, 438, 440, 441, 442, 443, 446, hoặc 447. Tốt hơn nếu các đột biến này khiến cho các phân tử đã được tạo chức năng qua trung gian tế bào tác động và, tùy ý, có ái lực biến đổi đối với Fc $\square$ R như được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp được bộc lộ và lấy làm ví dụ trong bản mô tả và đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này.

Sáng chế đặc biệt bao gồm kháng thể liên kết đặc hiệu với B7-H3 chứa vùng Fc biến thể với chức năng tác động biến đổi và/hoặc ái lực biến đổi để hoạt hoá và/hoặc ức chế tự thể, có:

- (I) biến đổi axit amin tại một hoặc nhiều vị trí sau đây: 235, 240, 241, 243, 244, 247, 262, 263, 269, 298, 328, hoặc 330 và tốt hơn nữa là một hoặc nhiều biến đổi sau đây: V240A, V240I, F241L, F243L, P244H, S298N, L328I, A330V; trong đó kháng thể thể biểu hiện chức năng tác động biến đổi so với kháng thể có vùng Fc kiểu đại thiếu biến đổi này;
- (II) biến đổi axit amin ở một hoặc nhiều vị trí sau đây: 268, 269, 270, 272, 276, 278, 283, 285, 286, 289, 292, 293, 301, 303, 305, 307, 309, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 340, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437, 438 hoặc 439 và tốt hơn nữa là một hoặc nhiều biến đổi sau đây: D280H, D280Q, D280Y, K290G, K290S, K290T, K290Y, E294N, Q295K, Y296P, S298D, S298N, S298P, S298V, Y300I, Y300L; trong đó kháng thể này biểu hiện chức năng tác động biến đổi so với kháng thể có vùng Fc kiểu đại thiếu biến đổi này;
- (III) biến đổi axit amin ở một hoặc nhiều vị trí sau đây: 255, 256, 258, 267, 268, 269, 270, 272, 276, 278, 280, 283, 285, 286, 289, 290, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 305, 307, 309, 312, 320, 322, 326, 329, 330, 332, 331, 333, 334, 335, 337, 338, 339, 340, 359, 360, 373, 376, 416, 419, 430, 434, 435, 437,

438, 439 và tốt hơn nữa là một hoặc nhiều biến đổi sau đây: T256A, H268N, E272Q, N286D, N286Q, N286S, K290A, K290S, S298A, R301M, D312A, K320E, K320M, K320Q, K320R, K322E, K326A, K326D, K326E, K326N, K326S, A330K, A339T, E333A, K334A, K334E, K334H, K334L, K334M, K334Q, K334V, T335K, T335Q, T359A, K360A, E430A; trong đó kháng thể này biểu hiện chức năng tác động biến đổi so với kháng thể có vùng Fc kiểu đại thiếu biến đổi này;

- (IV) biến đổi axit amin tại một hoặc nhiều vị trí sau đây: 252, 254, 265, 268, 269, 270, 278, 289, 292, 293, 294, 295, 296, 298, 300, 301, 303, 322, 324, 327, 329, 333, 335, 338, 340, 373, 376, 382, 388, 389, 414, 416, 419, 434, 435, 437, 438, hoặc 439; trong đó kháng thể này biểu hiện chức năng tác động giảm so với kháng thể có vùng Fc kiểu đại thiếu biến đổi này;
- (V) biến đổi axit amin tại một hoặc nhiều vị trí sau đây: 280, 283, 285, 286, 290, 294, 295, 298, 300, 301, 305, 307, 309, 312, 315, 331, 333, 334, 337, 340, 360, 378, 398, hoặc 430; trong đó kháng thể này biểu hiện chức năng tác động tăng cường so với kháng thể có vùng Fc kiểu đại thiếu biến đổi này;

hoặc

- (VI) biến đổi axit amin tại một hoặc nhiều vị trí sau đây: R255A, T256A, E258A, S267A, H268A, H268N, E272A, E272Q, N276A, D280A, E283A, H285A, N286A, N286D, N286Q, N286S, K290A, K290S, R301M, K320E, K320M, K320Q, K320R, K322E, K326A, K326D, K326E, K326S, A330K, P331A, T335Q, S337A, E430A; trong đó kháng thể này biểu hiện chức năng tác động tăng cường so với kháng thể có vùng Fc kiểu đại thiếu biến đổi này.

Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm việc sử dụng biến thể Fc đã biết bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này, như được nêu trong tài liệu Jefferis, B.J. et al. (2002) "Interaction Sites On Human IgG-Fc For FcγR: Current Models", Immunol. Lett. 82:57-65; Presta, L.G. et al. (2002) "Engineering Therapeutic Antibodies For Improved Function", Biochem. Soc. Trans. 30:487-90; Idusogie, E.E. et al. (2001) "Engineered Antibodies With Increased Activity To Recruit Complement", J. Immunol. 166:2571-75; Shields, R.L. et al. (2001) "High Resolution Mapping Of The Binding Site On



Human IgG1 For Fc Gamma RI, Fc Gamma RII, Fc Gamma RIII, And FcRn And Design Of IgG1 Variants With Improved Binding To The Fc gamma R", J. Biol. Chem. 276:6591-6604; Idusogie, E.E. et al. (2000) "Mapping Of The C1q Binding Site On Rituxan, A Chimeric Antibody With A Human IgG Fc", J. Immunol. 164:4178-84; Reddy, M.P. et al. (2000) "Elimination Of Fc Receptor-Dependent Effector Functions Of A Modified IgG4 Monoclonal Antibody To Human CD4", J. Immunol. 164:1925-1933; Xu, D. et al. (2000) "In Vitro Characterization of Five Humanized OKT3 Effector Function Variant Antibodies", Cell. Immunol. 200:16-26; Armour, K.L. et al. 1999) "Tái tổ hợp người IgG Phân tử Lacking Fc gamma Thụ thể I Liên kết Và Monocyte Triggervòng Các hoạt động", Eur. J. Immunol. 29:2613-24; Jefferis, R. et al. (1996) "Modulation Of Fc(Gamma)R And Human Complement Activation By IgG3-Core Oligosaccharide Interactions", Immunol. Lett. 54:101-04; Lund, J. et al. (1996) "Multiple Interactions Of IgG With Its Core Oligosaccharide Can Modulate Recognition By Complement And Human Fc Gamma Receptor I And Influence The Synthesis Of Its Oligosaccharide Chains", J. Immunol. 157:4963-4969; Hutchins et al. (1995) "Improved Biodistribution, Tumor Targeting, And Reduced Immunogenicity In Mice With A Gamma 4 Variant Of Campath-1H", Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.) 92:11980-84; Jefferis, R. et al. (1995) "Recognition Sites On Human IgG For Fc Gamma Receptors: The Role Of Glycosylation", Immunol. Lett. 44:111-17; Lund, J. et al. (1995) "Oligosaccharide-Protein Interactions In IgG Can Modulate Recognition By Fc Gamma Receptors", FASEB J. 9:115-19; Alegre, M.L. et al. (1994) "A Non-Activating "Humanized" Anti-CD3 Monoclonal Antibody Retains Immunosuppressive Properties In Vivo", Transplantation 57:1537-1543; Lund et al. (1992) "Multiple Binding Sites On The CH2 Domain Of IgG For Mouse Fc Gamma R11", Mol. Immunol. 29:53-59; Lund et al. (1991) "Human Fc Gamma RI And Fc Gamma RII Interact With Distinct But Overlapping Sites On Human IgG", J. Immunol. 147:2657-2662; Duncan, A.R. et al. (1988) "Localization Of The Binding Site For The Human High-Affinity Fc Receptor On IgG", Nature 332:563-564; US Patent Nos. 5,624,821; 5,885,573; 6,194,551; 7,276,586; and 7,317,091; and PCT Publications WO 00/42072 and PCT WO 99/58572.

Sáng chế bao gồm phân tử chứa vùng Fc biến thể bao gồm hoặc chứa đột biến

bắt kỳ trong số các đột biến được nêu trong Bảng 1 dưới đây.

| <b>Bảng 1</b><br><b>Biến đổi Fc được lấy làm ví dụ</b> |       |       |       |       |       |       |       |
|--------------------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|-------|
| Thay thế một vị trí                                    |       |       |       |       |       |       |       |
| S132I                                                  | F241W | D265N | D280Q | Y296T | D312A | L328I | K334E |
| A162V                                                  | F241Y | D265Q | D280Y | N297D | W313F | L328K | K334H |
| S219Y                                                  | F241Y | D265T | G281D | N297E | N315I | L328M | K334I |
| K222N                                                  | F243D | D265V | G281K | N297I | E318K | L328N | K334L |
| H224L                                                  | F243H | D265Y | G281P | N297S | K320E | L328P | K334M |
| T225S                                                  | F243L | V266A | G281Y | S298A | K320M | L328Q | K334N |
| P228E                                                  | F243L | V266I | V282M | S298D | K320Q | L328R | K334Q |
| P228G                                                  | F243Q | V266M | E283A | S298N | K320R | L328S | K334V |
| P228K                                                  | F243R | V266T | V284E | S298N | K322E | L328T | T335K |
| P228Y                                                  | F243W | S267A | V284L | S298N | V323I | L328V | T335Q |
| P230A                                                  | F243Y | H268A | V284N | S298P | N325A | L328W | I336E |
| P230E                                                  | P244H | H268N | V284T | S298V | N325D | L328Y | I336K |
| P230G                                                  | P245A | D270E | V284Y | T299A | N325E | A330I | I336Y |
| P230Y                                                  | P247G | P271A | H285A | T299D | N325F | A330K | S337A |
| A231E                                                  | P247L | P271D | N286A | T299E | N325G | A330L | A339T |
| A231G                                                  | P247V | P271E | N286D | T299F | N325H | A330S | M352L |
| A231K                                                  | K248M | P271F | N286S | T299G | N325I | A330V | T359A |
| A231P                                                  | R255A | P271G | K288N | T299H | N325K | A330Y | T359N |
| A231Y                                                  | T256A | P271H | K290A | T299I | N325L | P331A | K360A |
| P232E                                                  | E258A | P271I | K290G | T299K | N325M | I332A | T366N |
| P232G                                                  | V262A | P271K | K290S | T299L | N325P | I332D | T366S |
| P232K                                                  | V262E | P271L | K290T | T299M | N325R | I332E | F372Y |
| P232Y                                                  | V262F | P271M | K290Y | T299N | N325S | I332F | F372Y |
| E233D                                                  | V262I | P271N | P291D | T299P | N325T | I332G | I377F |
| E233G                                                  | V262T | P271Q | P291E | T299Q | N325V | I332H | I377N |
| L234I                                                  | V263A | P271R | P291G | T299R | N325W | I332K | V379L |
| L235D                                                  | V263I | P271S | P291H | T299S | N325Y | I332L | V379M |
| S239D                                                  | V263M | P271T | P291I | T299V | K326A | I332M | K392R |
| S239E                                                  | V263T | P271V | P291Q | T299W | K326D | I332N | P396H |
| S239N                                                  | V264A | P271W | P291T | T299Y | K326E | I332P | P396L |
| S239Q                                                  | V264E | P271Y | R292G | Y300I | K326E | I332Q | L398V |
| V240A                                                  | V264F | E272A | R292L | Y300L | K326N | I332R | S400P |
| V240I                                                  | V264I | E272Q | E294N | R301M | K326S | I332S | D401V |
| V240M                                                  | V264R | V273I | Q295K | R301M | K326T | I332T | S407I |
| V240T                                                  | V264T | F275L | Y296D | V302I | L328A | I332V | K414N |
| F241E                                                  | V264W | F275W | Y296E | S304D | L328D | I332W | E430A |
| V241I                                                  | D265F | F275Y | Y296H | S304H | L328E | I332Y |       |
| F241L                                                  | D265H | N276A | Y296N | S304L | L328F | E333A |       |
| F241R                                                  | D265I | D280A | Y296P | S304N | L328G | K334A |       |
| F241S                                                  | D265L | D280H | Y296Q | S304T | L328H | K334E |       |

**Bảng 1**  
**Biến đổi Fc được lấy làm ví dụ**

**Thay thế hai vị trí**

|              |               |                 |              |
|--------------|---------------|-----------------|--------------|
| I332E, A330L | S239N / I332Q | V279L, P395S    | P396L, P217S |
| I332E, L328D | S239Q / I332D | V284A, F372L    | P396L, P227S |
| I332E, L328E | S239Q/I332E   | K288N, K326N    | P396L, V323I |
| I332E, L328H | S239Q / I332N | K288N, A330S    | P396L, V240A |
| I332E, L328I | S239Q / I332Q | K290E, L142P    | P396L, L242F |
| I332E, L328M | V240I, V281M  | K290E, P227S    | P396L, P244H |
| I332E, L328N | F241L, E258G  | K290T, G371D    | P396L, T250A |
| I332E, L328Q | F241L/V262I   | P291S, P353Q    | P396L, R255L |
| I332E, L328T | F243L, E318K  | R292P, V305I    | P396L, E258D |
| I332E, L328V | F243I, V379L  | S298A/I332E     | P396L, H268D |
| I332E, N297D | P243L/V264I   | S298N, W381R    | P396L, H268N |
| I332E, N297E | K246T, Y319F  | S298N, S407R    | P396L, V303I |
| I332E, N297S | K246T, P396H  | K317N, F423-DEL | P396L, K326I |
| S166N, K409R | P247H, G285E  | K326E, K320E    | P396L, V305L |
| P232S, S304G | P247L, I377F  | K326E, A330T    | P396L, L358P |
| S239D/I332D  | P247L, E389G  | K326E, G385E    | P396L, K370E |
| S239D/I332E  | P247S, P396L  | A330V, Q419H    | P396L, S375C |
| S239D/I332N  | P247L, L398Q  | K334E, E233D    | P396L, V379M |
| S239D/I332Q  | P247L, L406F  | K334N, K246I    | P396L, N384K |
| S239E/D265N  | P247L, N421K  | K334E, K288M    | P396L, K392T |
| S239E/D265Q  | L251F, F372L  | K334E, R292L    | P396L, S400F |
| S239E/I332D  | L251F, S415I  | K334E, E308D    | P396L, L410H |
| S239E/I332E  | R255L, E318K  | K334E, E380D    | P396L, Q419H |
| S239E/I332N  | R255Q, K326E  | K334N, P396L    | P396L, Q419L |
| S239E/I332Q  | E258D, N384K  | A339V, Q347H    | P396L, V427A |
| S239N/I332D  | V263Q, E272D  | K370N, S440N    | D399E, G402D |
| S239N/I332E  | V264I / I332E | T394M, V397M    | D399E, M428L |
| S239N/I332N  | H268D, E318D  | P396L, K210M    |              |

**Thay thế ba vị trí**

|                     |                     |                     |
|---------------------|---------------------|---------------------|
| V185M, R292L, D399E | P217S, A378V, S408R | K218R, G281D, G385R |
| S192T, M252L, R301C | P247L, I253N, K334N | P247L, A330T, S440G |
| V125L, V215I, S408I | D312E, K327N, I378S | T355N, P387S, H435Q |
| R292L, T359N, P396L | E216D, E345K, S375I | P247L, A431V, S442F |
| F275I, K334N, V348M | K288N, A330S, P396L | A378V, N390I, V422I |
| F243L, R255L, E318K | G316D, A378V, D399E | V282E, V369I, L406F |
| K334E, T359N, T366S | N315I, V379M, T394M | V397M, T411A, S415N |
| K288N, A330S, P396L | P247L, W313R, E388G | T223I, T256S, L406F |
| F243I, V379L, G420V | R301H, K340E, D399E | K246N, P396L, Q419R |
| A231V, Q386H, V412M | K326I, P396L, S408N | P217A, T359A, P396L |
| E216D, K334R, S375I | K210M, K261N, P396L | V215I, K290V, P396L |
| T335N, P387S, H435Q | A330V, G427M, K438R | V263Q, E272D, Q419H |
| K246I, Q362H, K370E | K222E, V263Q, S298N | N276Y, T393N, W417R |

| <b>Bảng 1</b><br><b>Biến đổi Fc được lấy làm ví dụ</b> |                             |                      |
|--------------------------------------------------------|-----------------------------|----------------------|
| K334E, E380D, G446V                                    | E233G, P247S, L306P         | D270E, G316D, R416G  |
| V303I, V369F, M428L                                    | S219T, T225K, D270E         | D270E, K392T, P396L  |
| K246E, V284M, V308A                                    | R292P, F243L, V305I         | R255L, D270E, P396L  |
| E293V, Q295E, A327T                                    | V284M, R292L, K370N         | V240A, D270E, P396L  |
| Y319F, P352L, P396L                                    | D270E, K370E, P396L         | 270E, P396L, Q419HD  |
| K290T, N390I, P396L                                    | P247L, D270E, N421K         | S239D, A330L, I332E  |
| N297D, A330Y, I332E                                    | Y296D, N297D, I332E         | S239D, A330Y, I332E  |
| N297D, T299L, I332E                                    | Y296E, N297D, I332 E        | S239D, I332E, A330I  |
| N297D, T299I, I332E                                    | Y296H, N297D, I332E         | S239D, N297D, I332E  |
| N297D, T299L, I332E                                    | Y296N, N297D, I332E         | S239D, S298A, I332E  |
| N297D, T299V, I332E                                    | Y296Q, N297I, I332E         | S239D, V2641I, I332E |
| F243L, V262I, V264W                                    | Y296T, N297D, I332E         | S239E, N297D, I332E  |
| D265F, N297E, I332E                                    | P230A, E233D, I332E         | S239E, V264I, I332 E |
| D265Y, N297D, I332E                                    | P244H, P245A, P247V         | S239N, A330L, I332E  |
| V264E, N297D, I332E                                    | V264I, A330Y, I332E         | S239N, A330Y, I332E  |
| V264I, A330L, I332E                                    | V264I, S298A, I332E         | S239Q, V264I, I332E  |
| <b>Thay thế bốn vị trí</b>                             |                             |                      |
| A141V, H268L, K288E, P291S                             | T256S, V305I, K334E, N390S  |                      |
| E258D, T289A, H310Y, Y407V                             | D280E, S354F, A431D, L441I  |                      |
| K334E, T359N, T366S, Q386R                             | P343S, P353L, S375I, S383N  |                      |
| K326Q, K334E, T359N, T366S                             | E269K, K290N, Q311R, H433Y  |                      |
| K288R, T307A, K344E, P396L                             | K290E, V369A, T393A, P396L  |                      |
| V273I, K326E, L328I, P396L                             | K210N, K222I, K320M, P396L  |                      |
| F275L, Q362H, N384K, P396L                             | S219T, T225K, D270E, K360R  |                      |
| V282L, A330V, H433Y, T436R                             | P243L, S254T, A330V, N361D  |                      |
| R255L, D270E, Y300L, P396L,                            | F243L, D270E, K392N, P396L  |                      |
| R255L, D270E, R292G, P396L                             | F243L, R255L, D270E, P396L  |                      |
| V284M, S298N, K334E, R355W                             | S239D, D265F, N297D, I332E  |                      |
| D265Y, N297D, T299L, I332E                             | S239D, D265H, N297D, I332E  |                      |
| F241E, F2430, V262T, V264F                             | S239D, D265I, N297D, I332E  |                      |
| F241E, F243R, V262E, V264R                             | S239D, D265L, N297D, I332E  |                      |
| F241E, F243Y, V262T, V264R                             | S239D, D265T, N297D, I332E  |                      |
| F241L, F243L, V262I, V264I                             | S239D, D265V, N297D, I332E  |                      |
| F241R, F2430, V262T, V264R                             | S239D, D265Y, N297D, I332E  |                      |
| F241W, F243W, V262A, V264A                             | S239D, N297D, I332E, A330Y  |                      |
| F241Y, F243Y, V262T, V264T                             | S239D, N297D, I332E, K326E  |                      |
| N297D, I332E, S239D, A330L                             | S239D, N297D, I332E, L235D  |                      |
| N297D, S298A, A330Y, I 332E                            | S239D, V264I, A330L, I332E  |                      |
| S239D, A330Y, I332E, K326E                             | S239D, V264I, S298A, I332E  |                      |
| S239D, A330Y, I332E, K326T                             | S239E, V264I, A330Y, I332 E |                      |
| S239D, A330Y, I332E, L234I                             | S239D, A330Y, I332E, V264T  |                      |
| S239D, A330Y, I332E, L235D                             | S239D, A330Y, I332E, V266I  |                      |
| S239D, A330Y, I332E, V240I                             |                             |                      |



**Bảng 1**  
**Biến đổi Fc được lấy làm ví dụ**

| <b>Thay thế năm vị trí</b>                                    |                                   |
|---------------------------------------------------------------|-----------------------------------|
| V284M, S298N, K334E, R355W, R416T                             | K147T, Y202M, F275I, K334N, V348M |
| P217S, V305I, I309L, N390H, P396L                             | T335N, K370E, A378V, T394M, S424L |
| F243L, V305I, A378D, P396L, F404S                             | P244H, L358M, V379M, N384K, V397M |
| K222N, T335N, K370E, A378V, T394M                             | P244A, K326I, C367R, S375I, K447T |
| L235P, S304G, V305I, V323I, V382M                             | C229Y, A287T, V379M, P396L, L443V |
| F241E, F243Q, V262T, V264E, I332E                             | F241R, F243Q, V262T, V264R, I332E |
| F241E, F243R, V262E, V264R, I332E                             | S239E, V264I, S298A, A330Y, I332E |
| F241E, F243Y, V262T, V264R, I332E                             |                                   |
| <b>Thay thế nhiều hơn năm vị trí</b>                          |                                   |
| D221E, D270E, V308A, Q311H, P396L, G402D                      |                                   |
| T215P, K274N, A287G, K334N, L365V, P396L                      |                                   |
| F241Y, F243Y, V262T, V264T, N297D, I332E                      |                                   |
| N297D, T299F, I332E, N297D, T299H, I332E                      |                                   |
| D221Y, M252I, A330G, A339T, T359N, V422I, H433L               |                                   |
| S239D, N297D, I332E, A330Y, F241S, F243H, V262T, V264T        |                                   |
| K133M, F149Y, K205E, R214I, K218E, S383N, N384K, T256N, V262L |                                   |

Theo các phương án cụ thể, vùng Fc biến thể của kháng thể kháng B7-H3 này có:

- (1) leuxin ở vị trí 247, lysin ở vị trí 421 và axit glutamic ở vị trí 270;
- (2) threonin ở vị trí 392, leuxin ở vị trí 396, axit glutamic ở vị trí 270 và leuxin ở vị trí 243
- (3) histidin ở vị trí 419, leuxin ở vị trí 396 và axit glutamic ở vị trí 270;
- (4) histidin ở vị trí 419, leuxin ở vị trí 396, axit glutamic ở vị trí 270 và leuxin ở vị trí 243;
- (5) alanin ở vị trí 240, leuxin ở vị trí 396 và axit glutamic ở vị trí 270;
- (6) lysin ở vị trí 255 và leuxin ở vị trí 396;
- (7) lysin ở vị trí 255, leuxin ở vị trí 396 và axit glutamic ở vị trí 270;
- (8) lysin ở vị trí 255, leuxin ở vị trí 396, axit glutamic ở vị trí 270 và lysin ở vị trí 300;
- (9) lysin ở vị trí 255, leuxin ở vị trí 396, axit glutamic ở vị trí 270 và glyxin ở vị trí 292;

- (10) lysin ở vị trí 255, leuxin ở vị trí 396, axit glutamic ở vị trí 270 và leuxin ở vị trí 243;
- (11) axit glutamic ở vị trí 370, leuxin ở vị trí 396 và axit glutamic ở vị trí 270;
- (12) axit glutamic ở vị trí 270, axit aspartic ở vị trí 316 và glyxin ở vị trí 416;
- (13) leuxin ở vị trí 243, prolin ở vị trí 292, isoleuxin ở vị trí 305 và leuxin ở vị trí 396;
- (14) leuxin ở vị trí 243, axit glutamic ở vị trí 270, asparagin ở vị trí 392 và leuxin ở vị trí 396;
- (15) leuxin ở vị trí 243, leuxin ở vị trí 255, axit glutamic ở vị trí 270 và leuxin ở vị trí 396;
- (16) glutamin ở vị trí 297;
- hoặc
- (17) tổ hợp bất kỳ của các đột biến thay thế được nêu trong các mục từ (1) đến (16) ở trên.

Theo một số phương án, phân tử theo sáng chế còn bao gồm một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá, sao cho một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon được gắn cộng hoá trị vào phân tử này. Tốt hơn nếu phân tử theo sáng chế với một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá và/hoặc một hoặc nhiều biến đổi ở vùng Fc mang lại hoặc có chức năng tác động tăng cường qua trung gian kháng thể, ví dụ, hoạt tính ADCC tăng cường so với kháng thể gốc. Theo một số phương án, sáng chế còn bao gồm phân tử gồm một hoặc nhiều biến đổi axit amin được biết là tương tác trực tiếp hoặc gián tiếp với gốc hydrat cacbon của kháng thể, bao gồm nhưng không giới hạn ở, axit amin ở các vị trí 241, 243, 244, 245, 245, 249, 256, 258, 260, 262, 264, 265, 296, 299 và 301. Axit amin tương tác trực tiếp hoặc gián tiếp với gốc hydrat cacbon của kháng thể là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, xem tài liệu Jefferis et al., 1995 Immunology Letters, 44: 111-7 được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

Theo một phương án khác, sáng chế bao gồm phân tử đã được biến đổi bằng cách đưa một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá vào một hoặc nhiều vị trí của phân tử, tốt hơn nếu không làm thay đổi chức năng của phân tử đó, ví dụ, hoạt tính liên kết với kháng

nguyên đích hoặc Fc□R. Vị trí glycosyl hoá có thể được đưa vào vùng biến đổi và/hoặc hằng định của phân tử theo sáng chế. Trong bản mô tả, “vị trí glycosyl hoá” bao gồm trình tự axit amin cụ thể bất kỳ ở kháng thể mà oligosacarit (tức là hydrat cacbon chứa hai hoặc nhiều hơn hai đường đơn liên kết với nhau) sẽ được gắn đặc hiệu và cộng hoá trị vào kháng thể này. Các mạch bên oligosacarit thường được liên kết với khung của kháng thể qua hoặc liên kết với N hoặc O. Glycosyl hoá liên kết với N chỉ việc gắn gốc oligosacarit vào mạch bên của gốc asparagin. Glycosyl hoá liên kết với O chỉ việc gắn gốc oligosacarit vào axit hydroxyamin, ví dụ, serin, threonin. Phân tử theo sáng chế có thể chứa một hoặc nhiều vị trí glycosyl hoá, bao gồm vị trí glycosyl hoá liên kết với N và liên kết với O. Vị trí glycosyl hoá bất kỳ cho quá trình glycosyl hoá liên kết với N hoặc liên kết với O đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể được sử dụng theo sáng chế. Vị trí glycosyl hoá liên kết với N lấy làm ví dụ hữu dụng theo các phương pháp theo sáng chế là trình tự axit amin: Asn-X-Thr/Ser, trong đó X có thể là axit amin bất kỳ và Thr/Ser là threonin hoặc serin. Vị trí hoặc các vị trí này có thể được đưa vào phân tử theo sáng chế bằng các phương pháp đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế đề cập (ví dụ, xem tài liệu *In vitro* MUTAGENESIS, RECOMBINANT DNA: A SHORT COURSE, J. D. Watson, et al. W.H. Freeman and Company, New York, 1983, chapter 8, pp. 106-116 được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Một phương pháp lấy làm ví dụ để đưa vị trí glycosyl hoá vào phân tử theo sáng chế có thể bao gồm: biến đổi hoặc đột biến trình tự axit amin của phân tử để thu được trình tự Asn-X-Thr/Ser mong muốn.

Theo một số phương án, sáng chế bao gồm các phương pháp biến đổi hàm lượng hydrat cacbon trong phân tử theo sáng chế bằng cách thêm vào hoặc làm khuyết một vị trí glycosyl hoá. Các phương pháp biến đổi hàm lượng hydrat cacbon trong kháng thể là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và được bao gồm trong sáng chế, ví dụ, xem Patent Mỹ số 6,218,149; EP 0 359 096 B1; Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2002/0028486; WO 03/035835; Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2003/0115614; Patent Mỹ số 6,218,149; Patent Mỹ số 6,472,511; tất cả các tài liệu này đều được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ. Theo các phương án khác, sáng chế bao gồm các phương pháp biến đổi hàm lượng hydrat cacbon trong phân tử theo sáng chế bằng cách xoá một hoặc nhiều gốc hydrat cacbon nội sinh trong phân tử. Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao gồm việc dịch chuyển vị trí glycosyl hoá của vùng Fc của kháng thể, bằng cách biến

đổi các vị trí liên kề với vị trí 297. Theo một phương án cụ thể, sáng chế bao gồm việc biến đổi vị trí 296 sao cho vị trí 296 được glycosyl hoá chứ không phải vị trí 297.

Chức năng tác động cũng có thể được biến đổi bằng các kỹ thuật như đưa một hoặc nhiều gốc xystein vào vùng Fc, nhờ đó cho phép diễn ra sự hình thành liên kết disulfua liên chuỗi trong vùng này, dẫn đến việc tạo ra kháng thể homodime có thể có khả năng thu nhận cải thiện và/hoặc khả năng tiêu diệt tế bào qua trung gian bổ thể gia tăng và ADCC gia tăng (Caron, P.C. et al. (1992) “Engineered Humanized Dimeric Forms Of IgG Are More Effective Antibodies”, J. Exp. Med. 176:1191-1195; Shopes, B. (1992) “A Genetically Engineered Human IgG Mutant With Enhanced Cytolytic Activity”, J. Immunol. 148(9):2918-2922. Kháng thể homodime có hoạt tính kháng u tăng cường cũng có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất liên kết ngang hai chức khác loại như được nêu trong ấn phẩm của Wolff, E.A. et al. (1993) “Monoclonal Antibody Homodimers: Enhanced Antitumor Activity In Nude Mice”, Cancer Research 53:2560-2565. Theo cách khác, kháng thể có thể được xử lý kỹ thuật mà có vùng Fc kép và từ đó có thể khả năng ly giải bổ thể và khả năng ADCC tăng cường (Stevenson, G.T. et al. (1989) “A Chimeric Antibody With Dual Fc Regions (bisFabFc) Prepared By Manipulations At The IgG Hinge”, Anti-Cancer Drug Design 3:219-230).

#### E. DART™ B7-H3 (Chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép)

Như nêu ở trên, sáng chế còn đề cập đến phân tử “DART™” (chất phản ứng đối mục tiêu có ái lực kép) chứa ít nhất hai mạch polypeptit mà tạo thành ít nhất là hai vị trí liên kết epitop, ít nhất một trong số đó liên kết đặc hiệu với B7-H3.

Theo các phương án được ưu tiên, mạch polypeptit thứ nhất của DART™ gồm:

- (i) miền (A) gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch (VL1) thứ nhất đặc hiệu đối với epitop (1);
- (ii) miền (B) gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch (VH2) thứ hai đặc hiệu đối với epitop (2); và
- (iii) miền (C).

Mạch polypeptit thứ hai của DART™ này gồm:

- (i) miền (D) gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nhẹ của globulin

miền dịch (VL2) thứ hai đặc hiệu đối với epitop (2);

(ii) miền (E) gồm vùng liên kết của miền biến đổi chuỗi nặng của globulin miễn dịch (VH1) thứ nhất đặc hiệu đối với epitop (1); và

(iii) miền (F).

Các miền (A) và (B) của DART™ không liên kết với nhau để tạo thành vị trí liên kết epitop. Tương tự, các miền (D) và (E) của DART™ không liên kết với nhau để tạo thành vị trí liên kết epitop. Thay vào đó, các miền (A) và (E) của DART™ liên kết với nhau để tạo thành vị trí liên kết để liên kết với epitop (1); các miền (B) và (D) DART™ liên kết với nhau để tạo thành vị trí liên kết mà liên kết với epitop (2). Các miền (C) và (F) được liên kết cộng hoá trị với nhau.

Mỗi mạch polypeptit của phân tử DART™ gồm miền VL và miền VH, mà được liên kết cộng hoá trị sao cho các miền này bị ràng buộc để không tự lắp ráp. Tương tác của hai trong số các mạch polypeptit sẽ tạo ra hai cặp VL-VH, tạo ra hai vị trí liên kết epitop, tức là phân tử hoá trị hai. Cả miền VH hoặc VL bị ràng buộc ở vị trí bất kỳ trong mạch polypeptit, tức là bị giới hạn ở đầu tận amino (N) hoặc đầu tận carboxy (C), lần miền bị giới hạn ở vị trí tương đối của chúng với nhau, tức là miền VL đều không thể là đầu tận N đối với miền VH và ngược lại. Hạn chế duy nhất là mạch polypeptit bổ sung phải có sẵn để tạo thành DART™ chức năng. Khi miền VL và miền VH có nguồn gốc từ cùng một kháng thể, thì hai mạch polypeptit bổ sung có thể giống hệt nhau. Ví dụ, khi miền liên kết có nguồn gốc từ kháng thể đặc hiệu với epitop A (tức là miền liên kết được tạo ra từ tương tác VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>), thì mỗi polypeptit sẽ bao gồm VH<sub>A</sub> và VL<sub>A</sub>. Quá trình homodime hoá hai mạch polypeptit của kháng thể sẽ tạo thành hai vị trí liên kết VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub>, tạo ra kháng thể hóa trị hai một đặc hiệu. Khi miền VL và miền VH có nguồn gốc từ kháng thể đặc hiệu đối với các kháng nguyên khác nhau, thì sự tạo thành DART™ chức năng hai đặc hiệu đòi hỏi tương tác của hai mạch polypeptit khác nhau, tức là sự tạo thành heterodime. Ví dụ, đối với DART™ hai đặc hiệu, một mạch polypeptit sẽ bao gồm VL<sub>A</sub> và VL<sub>B</sub>; quá trình homodime của chuỗi này sẽ tạo ra hai vị trí liên kết VL<sub>A</sub>-VH<sub>B</sub>, hoặc không vị trí nào trong số đó không liên kết hoặc liên kết không thể dự đoán được. Trái lại, khi hai mạch polypeptit khác nhau tự do tương tác, ví dụ, trong hệ biểu hiện tái tổ hợp, thì một mạch gồm VL<sub>A</sub> và VH<sub>B</sub> và mạch còn lại gồm

VL<sub>B</sub> và VH<sub>A</sub>, hai vị trí liên kết khác nhau sẽ tạo thành: VL<sub>A</sub>-VH<sub>A</sub> và VL<sub>B</sub>-VH<sub>B</sub>. Đối với toàn bộ cặp mạch polypeptit DART™, khả năng sắp trình tự sai hoặc liên kết sai của hai mạch này là có thể xảy ra, tức là tương tác của các miền VL-VL hoặc VH-VH; tuy nhiên, việc tinh chế kháng thể thể đôi chức năng là dễ dàng được kiểm soát dựa trên độ đặc hiệu miễn dịch của vị trí liên kết được dime hóa thích hợp bằng cách sử dụng phương pháp dựa trên ái lực đã biết bất kỳ trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được lấy làm ví dụ trong bản mô tả này, ví dụ, phương pháp sắc ký ái lực.

Một hoặc nhiều mạch polypeptit của DART™ có thể tùy ý chứa miền Fc hoặc một phần của nó (ví dụ miền CH2, hoặc miền CH3). Miền Fc hoặc một phần của nó có thể thu được từ isotyp hoặc alotyp của globulin miễn dịch bất kỳ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, IgA, IgD, IgG, IgE và IgM. Theo các phương án được ưu tiên, miền Fc (hoặc một phần của nó) thu được từ IgG. Theo các phương án cụ thể, isotyp IgG là IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 hoặc alotyp của chúng. Theo một phương án, phân tử kháng thể thể đôi gồm miền Fc, miền Fc này gồm miền CH2 và miền CH3 được chọn độc lập từ isotyp globulin miễn dịch bất kỳ (tức là miền Fc gồm miền CH2 thu được từ IgG và miền CH3 thu được từ IgE, hoặc miền CH2 thu được từ IgG1 và miền CH3 thu được từ IgG2, v.v.). Miền Fc có thể được xử lý kỹ thuật thành mạch polypeptit gồm phân tử kháng thể thể đôi theo sáng chế ở vị trí bất kỳ so với các miền còn lại hoặc một phần của mạch polypeptit này (ví dụ, miền Fc, hoặc một phần của nó, có thể là đầu tận C với cả miền VL và miền VH của mạch polypeptit; có thể là đầu tận N với cả miền VL và miền VH; hoặc có thể là đầu tận N với một miền và đầu tận C với miền còn lại (tức là giữa hai miền của mạch polypeptit)).

Miền Fc trong mạch polypeptit của phân tử DART™ ưu tiên dime hóa, dẫn đến việc tạo ra phân tử DART™ có tính chất giống globulin miễn dịch, ví dụ, tương tác Fc-FcγR. Kháng thể thể đôi chứa Fc có thể là dime, ví dụ, gồm hai mạch polypeptit, mỗi mạch này chứa miền VH, miền VL và miền Fc. Việc dime hoá các mạch polypeptit này tạo ra DART™ hoá trị hai gồm miền Fc, mặc dù với cấu trúc khác với cấu trúc của kháng thể hoá trị hai chưa được biến đổi. Phân tử DART™ sẽ biểu hiện kiểu hình biến đổi so với globulin miễn dịch kiểu đại, ví dụ, thời gian bán rã của huyết thanh biến đổi, tính chất liên kết biến đổi, v.v. Theo các phương án khác, phân tử DART™ chứa miền

Fc có thể là tetrame. Các tetrame này gồm hai mạch polypeptit nặng hơn, tức là mạch polypeptit gồm các miền VL, VH và Fc và hai mạch polypeptit “nhẹ hơn”, tức là mạch polypeptit gồm VL và VH. Các mạch nhẹ hơn và nặng hơn này tương tác để tạo thành monome và các monome này tương tác thông qua các miền Fc chưa bắt cặp của chúng để tạo thành phân tử giống Ig. DART™ giống Ig này là hợp chất hoá trị bốn và cũng có thể một đặc hiệu, hai đặc hiệu hoặc ba đặc hiệu.

Sự tạo thành phân tử kháng thể thể đôi bốn đặc hiệu như được nêu trên đòi hỏi tương tác của bốn mạch polypeptit khác nhau. Tương tác này rất khó để đạt được hiệu quả trong hệ sản xuất tái tổ hợp tế bào đơn, do nhiều biến thể bắt cặp sai của chuỗi tiềm năng. Một giải pháp để làm tăng xác suất bắt cặp sai, là xử lý kỹ thuật các đột biến loại “tra khóa vào ổ” thành cặp đôi mạch polypeptit mong muốn. Các đột biến này ưu tiên heterodime hơn hóa là homo dime hóa. Ví dụ, đối với tương tác Fc-Fc, đột biến thay thế axit amin (tốt hơn là đột biến thay thế với axit amin gồm nhóm bên lớn tạo ‘khóa’, ví dụ, tryptophan) có thể được đưa vào miền CH2 hoặc CH3 sao cho sự cản trở không gian sẽ chặn được tương tác với miền đột biến tương tự và sẽ ép miền đột biến bắt cặp với miền mà đột biến bổ sung, hoặc điều tiết đã được xử lý kỹ thuật thành, tức là ‘ổ’ (ví dụ, đột biến thay thế với glyxin). Các tập đột biến này có thể được xử lý kỹ thuật thành cặp polypeptit bất kỳ gồm phân tử kháng thể thể đôi và còn, được xử lý kỹ thuật thành phần bất kỳ của các mạch polypeptit của cặp này. Các phương pháp xử lý kỹ thuật protein để ưu tiên heterodime hoá hơn là homodime hoá là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này, đặc biệt đối với việc xử lý kỹ thuật các phân tử giống globulin miễn dịch, và được bao hàm trong bản mô tả này (ví dụ, xem tài liệu Ridgway et al. (1996) “Knobs-Into-Holes’ Engineering Of Antibody CH3 Domains For Heavy Chain Heterodimerization”, Protein Engr. 9:617-621, Atwell et al. (1997) “Stable Heterodimers From Remodeling The Domain Interface Of A Homodimer Using A Phage Display Library”, J. Mol. Biol. 270: 26-35, và Xie et al. (2005) “A New Format Of Bispecific Antibody: Highly Efficient Heterodimerization, Expression And Tumor Cell Lysis”, J. Immunol. Methods 296:95-101; mỗi tài liệu này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn toàn bộ.

Sáng chế còn bao gồm phân tử kháng thể thể đôi gồm miền Fc biến thể hoặc

miền Fc khớp nối biến thể (hoặc một phần của chúng), trong đó miền Fc biến thể gồm ít nhất một biến đổi axit amin (ví dụ thay thế, cài xen hoặc làm khuyết) so với miền Fc kiểu đại hoặc miền Fc khớp nối tương đương (hoặc một phần của chúng). Phân tử chứa miền Fc biến thể hoặc miền Fc khớp nối biến thể (hoặc một phần của chúng) (ví dụ, kháng thể) thường có kiểu hình thay đổi so với phân tử chứa miền Fc hoặc miền Fc khớp nối loại đại hoặc các phần của chúng. Kiểu hình biến thể có thể được biểu hiện dưới dạng thời gian bán rã trong huyết thanh thay đổi, độ ổn định thay đổi, sự miễn cảm đối với enzym tế bào thay đổi hoặc chức năng tác động thay đổi như được thử nghiệm trong thử nghiệm phụ thuộc vào NK hoặc phụ thuộc vào đại thực bào. Các biến đổi miền Fc được biết là làm thay đổi chức năng tác động được bộc lộ ở trên.

Sáng chế còn bao gồm phân tử chứa miền khớp nối. Miền khớp nối có thể thu được từ isotyp hoặc alotyp của globulin miễn dịch bao gồm IgA, IgD, IgG, IgE và IgM. Theo các phương án được ưu tiên, miền khớp nối thu được từ IgG, trong đó isotyp của IgG là IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4, hoặc alotyp của chúng. Miền khớp nối này có thể được xử lý kỹ thuật thành mạch polypeptit gồm phân tử kháng thể thể đôi cùng với miền Fc sao cho phân tử kháng thể thể đôi này gồm miền Fc khớp nối. Theo một số phương án nhất định, miền khớp nối và miền Fc độc lập được chọn từ các isotyp globulin miễn dịch đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được lấy ví dụ trong bản mô tả. Theo các phương án khác, miền khớp nối và miền Fc được tách bằng ít nhất một miền khác của mạch polypeptit, ví dụ, miền VL. Miền khớp nối, hoặc tùy ý miền Fc khớp nối, có thể được xử lý kỹ thuật thành polypeptit của sáng chế ở vị trí bất kỳ so với các miền khác hoặc một phần của mạch polypeptit này. Theo một số phương án nhất định, mạch polypeptit của sáng chế bao gồm miền khớp nối, miền khớp nối này là ở đầu tận C của mạch polypeptit, trong đó mạch polypeptit này không chứa miền Fc. Theo các phương án khác nữa, mạch polypeptit theo sáng chế bao gồm miền Fc khớp nối, miền Fc khớp nối này là ở đầu tận C của mạch polypeptit. Theo các phương án khác, mạch polypeptit theo sáng chế bao gồm miền Fc khớp nối, miền Fc khớp nối này là ở đầu tận N của mạch polypeptit.

Mỗi miền của mạch polypeptit của DART™, tức là các miền VL, VH và Fc có thể được tách bằng chất liên kết peptit. Chất liên kết peptit này có thể có độ dài là 0, 1,



2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, hoặc 9 axit amin. Theo một số phương án nhất định, trình tự chất liên kết axit amin là GGGSGGGG (SEQ ID NO:52) được mã hoá bởi trình tự axit nucleic ggaggcggat ccggagcgaggc (SEQ ID NO:53). Mạch polypeptit của phân tử DART™ có thể được xử lý kỹ thuật để gồm ít nhất một gốc xystein tương tác với gốc xystein bản sao trên mạch polypeptit thứ hai của DART™ để tạo thành liên kết disulfua liên chuỗi. Các liên kết disulfua liên chuỗi này được dùng để làm ổn định phân tử DART™, nhờ đó cải thiện sự biểu hiện và khôi phục trong hệ tái tổ hợp, giúp phối trộn ổn định và thống nhất và cải thiện độ ổn định của sản phẩm được phân lập và/hoặc được tinh chế in vivo. Gốc xystein có thể được đưa vào dưới dạng một axit amin đơn lẻ hoặc dưới dạng một phần của trình tự axit amin lớn hơn, ví dụ miền khớp nối, ở phần bất kỳ của mạch polypeptit. Theo một phương án cụ thể, gốc xystein có thể được xử lý kỹ thuật để xuất hiện ở đầu tận C của mạch polypeptit. Theo một số phương án, gốc xystein được đưa vào mạch polypeptit trong trình tự axit amin LGGC. Theo một phương án cụ thể, đầu tận C của mạch polypeptit gồm phân tử DART™ theo sáng chế gồm trình tự axit amin LGGC (SEQ ID NO:54). Theo phương án khác, gốc xystein được đưa vào polypeptit trong trình tự axit amin chứa miền khớp nối, ví dụ EPKSCDKTHTCPP (SEQ ID NO:55) hoặc ESKYGPPCPS (SEQ ID NO:56). Theo một phương án cụ thể, đầu tận C của mạch polypeptit của phân tử DART™ theo sáng chế chứa trình tự axit amin của miền khớp nối IgG, ví dụ SEQ ID NO:55 hoặc SEQ ID NO:56. Theo một phương án khác, đầu tận C của mạch polypeptit của phân tử DART™ theo sáng chế chứa trình tự axit amin VEPKSC (SEQ ID NO:57), có thể được mã hoá bởi trình tự nucleotit gttgagccca aatcttgt (SEQ ID NO:58). Theo một phương án khác, gốc xystein được đưa vào mạch polypeptit trong trình tự axit amin LGGCFNRGEC (SEQ ID NO:59), mà có thể được mã hoá bởi trình tự nucleotit ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt (SEQ ID NO:60). Theo một phương án cụ thể, đầu tận C của mạch polypeptit gồm DART™ theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin LGGCFNRGEC (SEQ ID NO:59). Theo một phương án khác, gốc xystein được đưa vào mạch polypeptit trong trình tự axit amin FNRGEC (SEQ ID NO:61), có thể được mã hoá bởi trình tự nucleotit ttcaacaggg gagagtgt (SEQ ID NO:62). Theo một phương án cụ thể, đầu tận C của mạch polypeptit gồm DART™ theo sáng chế bao gồm trình tự axit amin FNRGEC (SEQ ID NO:61).

Theo phương án nhất định, phân tử kháng thể đôi gồm ít nhất hai mạch

polypeptit, mỗi mạch gồm trình tự axit amin LGGC (SEQ ID NO:54) và được liên kết cộng hoá trị với nhau bằng liên kết disulfua giữa các gốc xystein trong trình tự LGGC (SEQ ID NO:54). Theo một phương án cụ thể khác, phân tử kháng thể thể đôi gồm ít nhất hai mạch polypeptit, một mạch trong số đó chứa trình tự FNRGEC (SEQ ID NO:61) trong khi mạch còn lại gồm miền khớp nối (chứa ít nhất một gốc xystein), trong đó ít nhất hai mạch polypeptit được liên kết cộng hoá trị bởi liên kết disulfua giữa các gốc xystein trong FNRGEC (SEQ ID NO:61) và gốc xystein trong miền khớp nối. Theo các khía cạnh cụ thể, gốc xystein chịu trách nhiệm đối với liên kết disulfua trong miền khớp nối là Cys-128 (như được đánh số theo Kabat EU; nằm trong miền khớp nối của chuỗi nặng IgG nguyên vẹn chưa được biến đổi) và gốc xystein bản sao trong SEQ ID NO:23 là Cys-214 (như được đánh số theo Kabat EU; nằm ở đầu tận C của chuỗi nhẹ IgG nguyên vẹn chưa được biến đổi) (Elkabetz et al. (2005) "Cysteines In CH1 Underlie Retention Of Unassembled Ig Heavy Chains", J. Biol. Chem. 280:14402-14412). Theo các phương án khác, ít nhất một gốc xystein được xử lý kỹ thuật để xuất hiện ở đầu tận N của chuỗi axit amin. Theo các phương án khác, ít nhất một gốc xystein được xử lý kỹ thuật để xuất hiện trong phần liên kết của mạch polypeptit của phân tử kháng thể thể đôi. Theo các phương án khác, miền VH hoặc miền VL được xử lý kỹ thuật để gồm ít nhất một biến đổi axit amin so với miền VH hoặc miền VL ban đầu sao cho biến đổi axit amin này gồm đột biến thay thế của axit amin ban đầu bằng xystein.

Theo một khía cạnh khác nữa của phương án này, miền (C) của mạch polypeptit thứ nhất gồm trình tự axit amin VEPKSC (SEQ ID NO:57), thu được từ miền khớp nối của IgG người và có thể được mã hoá bởi trình tự nucleotit gttgagccca aatcttgt (SEQ ID NO:58). Theo một khía cạnh khác của phương án này, miền (F) của mạch polypeptit thứ hai gồm trình tự axit amin VEPKSC (SEQ ID NO:57). Theo một số khía cạnh của phương án này, miền (C) của mạch polypeptit thứ nhất gồm 6 axit amin đầu tận C của chuỗi nhẹ kapa người, FNRGEC (SEQ ID NO:61); và miền (F) của mạch polypeptit thứ hai gồm trình tự axit amin VEPKSC (SEQ ID NO:57) hoặc miền khớp nối. Theo các khía cạnh khác của phương án này, miền (F) của mạch polypeptit thứ hai gồm 6 axit amin đầu tận C của chuỗi nhẹ kapa người, FNRGEC (SEQ ID NO:61); và miền (C) của mạch polypeptit thứ nhất gồm trình tự axit amin VEPKSC (SEQ ID NO:57) hoặc miền khớp nối.

Hiển nhiên khi xem các phần trên là các polypeptit riêng lẻ của DART™ hai đặc hiệu có thể tạo thành hai loại homodime và một loại heterodime. Theo một phương án của sáng chế, polypeptit tích điện có thể được thêm vào đầu tận C của một polypeptit, hoặc tốt hơn nữa là cả, cả hai polypeptit của DART™. Bằng cách lựa chọn các polypeptit tích điện có điện tích trái dấu cho từng polypeptit riêng lẻ của DART™ hai đặc hiệu, thể bao gồm các polypeptit tích điện này ưu tiên sự tạo thành các heterodime và làm giảm sự tạo thành homodime. Tốt hơn nếu polypeptit tích điện dương sẽ chứa một hàm lượng đáng kể của arginin, glutamin, histidin và/hoặc lysin (hoặc hỗn hợp của các axit amin này) và polypeptit được tích điện âm sẽ chứa một hàm lượng đáng kể của aspartat hoặc glutamat (hoặc hỗn hợp của axit amin này). Các polypeptit tích điện dương chứa một hàm lượng lysin đáng kể và các polypeptit tích điện âm chứa một hàm lượng glutamat đáng kể được đặc biệt ưu tiên. Để tối đa hoá lực hút tĩnh điện giữa các polypeptit tích điện trái dấu, thì ưu tiên sử dụng các polypeptit có khả năng đồng thời có cấu hình xoắn ốc.

Do đó, theo một phương án được ưu tiên, “cuộn E” tích điện dương sẽ được đi kèm với một trong số các polypeptit đang được sử dụng để tạo ra DART™ hai đặc hiệu và “cuộn K” tích điện âm sẽ được đi kèm với polypeptit thứ hai của DART™. Cuộn E đặc biệt được ưu tiên sẽ có trình tự: (EVAALEK)<sub>4</sub> [tức là (SEQ ID NO:63) EVAALEKEVAALEKEVAALEKEVAALEK]. Cuộn K đặc biệt được ưu tiên sẽ có trình tự: (KVAALKE)<sub>4</sub> [tức là (SEQ ID NO:64) KVAALKEKVAALKEKVAALKEKVAALKE].

Polypeptit DART™ được ưu tiên có cuộn E này sẽ có trình tự chung: [Miền VL]—[GGGSGGGG]—[miền VH]—[(EVAALEK)<sub>4</sub>]—GGGNS, trong đó VL là miền Ig chuỗi nhẹ biến đổi của DART™, GGGSGGGG là SEQ ID NO:52, VH là miền Ig chuỗi nặng biến đổi của DART™, (EVAALEK)<sub>4</sub> là SEQ ID NO:63 và GGGNS là SEQ ID NO:65. Polypeptit DART™ được ưu tiên có cuộn K sẽ có trình tự chung: [Miền VL]—[GGGSGGGG]—[Miền VH]—[(KVAALKE)<sub>4</sub>]—GGGNS, trong đó VL là miền Ig chuỗi nhẹ biến đổi của DART™, GGGSGGGG là SEQ ID NO:52, VH là miền Ig chuỗi nặng biến đổi của DART™, (KVAALKE)<sub>4</sub> là SEQ ID NO:64 và GGGNS là SEQ ID NO:65.

Theo một phương án khác, các vùng Fc có thể được liên kết với cuộn E và/hoặc cuộn K của DART™ có cuộn E hoặc cuộn K. Ngoài ra, việc tách giữa các vùng Fc và miền VH DART™ của DART™ chứa Fc được mong đợi trong các trường hợp có sự sắp xếp tách biệt các miền này ít hơn dẫn đến việc làm giảm tương tác giữa các miền này và các phối tử liên kết của chúng hoặc theo cách khác cản trở sự lắp ráp DART™. Mặc dù các đoạn tách cho trình tự axit amin bất kỳ có thể được sử dụng, tốt hơn nếu sử dụng đoạn tách tạo cuộn xoắn  $\alpha$ , để kéo dài và làm miền Fc nhô một cách tối đa ra khỏi miền biến đổi. Vì các polypeptit có cuộn mô tả ở trên có chức năng tích điện trái dấu bổ sung để thúc đẩy sự hình thành heterodime, nên các phân tử này là đoạn tách đặc biệt được ưu tiên. Phân tử Fc-DART™ chứa cuộn như vậy mang lại các lợi ích tương tự như lợi ích của Fc-DART™, bao gồm sự cải thiện thời gian bán rã trong huyết thanh và làm mới chức năng tác động. Các polypeptit cuộn E và cuộn K mô tả ở trên đặc biệt được ưu tiên đối với mục đích này. Do đó, theo một phương án ưu tiên, DART™ chứa Fc cuộn E sẽ có trình tự chung: [Miền VL]—[GGGSGGGG]—[Miền VH]—[(EVAALEK)<sub>4</sub>]—GGG—Fc miền bắt đầu với D234 (đánh số theo Kabat), trong đó VL là miền Ig chuỗi nhẹ biến đổi DART™, GGGSGGGG là SEQ ID NO:52, VH là miền Ig chuỗi nặng biến đổi DART™ và (EVAALEK)<sub>4</sub> là SEQ ID NO:63. Tương tự, theo một phương án ưu tiên, DART™ chứa Fc cuộn K sẽ có trình tự chung: [Miền VL]—[GGGSGGGG]—[Miền VH]—[(KVAALKE)<sub>4</sub>]—GGG—Fc miền bắt đầu với D234 (đánh số theo Kabat), trong đó VL là miền Ig chuỗi nhẹ biến đổi DART™, GGGSGGGG là SEQ ID NO:51, VH là miền Ig chuỗi nặng biến đổi DART™ và (KVAALKE)<sub>4</sub> là SEQ ID NO:64.

Như đã nêu trên, phân tử DART™ chứa cuộn hoặc phân tử DART™ chứa Fc chứa cuộn có thể chỉ chứa một đoạn tách cuộn xoắn, hoặc nó có thể chứa nhiều hơn một đoạn tách (ví dụ, hai đoạn tách, tốt hơn nếu tích điện trái dấu, trong đó một đoạn tách được liên kết với từng miền VH của các polypeptit DART™). Bằng cách liên kết vùng Fc với (các) phân tử tách này, khả năng tạo ra các phiên bản hoá trị hai, hoá trị ba, v.v. của phân tử Fc-DART™ bằng cách hoán vị mạch được tăng cường. Do đó các phân tử Fc-DART™ có thể được sản xuất để tạo ra các monome hoặc dime tùy thuộc vào việc liệu miền Fc được liên kết với một hay cả hai miền VH của DART™

## 1. Tính linh hoạt của phân tử DART™ B7-H3

DART™ hai đặc hiệu theo sáng chế có thể đồng thời liên kết hai epitop riêng biệt và khác nhau. Theo một số phương án, epitop là từ cùng một kháng nguyên. Theo các phương án khác, epitop là từ các kháng nguyên khác nhau. Theo các phương án được ưu tiên, ít nhất một vị trí liên kết epitop là đặc hiệu đối với yếu tố quyết định được biểu hiện trên tế bào tác động miễn dịch (ví dụ thụ thể CD3, CD16, CD32, CD64, tế bào T, v.v.) mà được biểu hiện trên các lympho bào T, tế bào diệt tự nhiên (NK) hoặc tế bào đơn nhân khác. Theo một phương án, phân tử DART™ liên kết với yếu tố quyết định tế bào tác động và cũng hoạt hoá tế bào tác động này. Về mặt này, các phân tử DART™ theo sáng chế có thể biểu hiện chức năng giống như Ig không phụ thuộc vào việc liệu chúng còn chứa miền Fc hay không (ví dụ, khi được thử nghiệm trong thử nghiệm chức năng tác động bất kỳ đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này hoặc được lấy ví dụ trong bản mô tả (ví dụ, thử nghiệm ADCC). Theo một số phương án nhất định, DART™ hai đặc hiệu theo sáng chế liên kết với cả kháng nguyên ung thư trên tế bào u và yếu tố quyết định tế bào tác động trong khi hoạt hoá tế bào này. Theo các phương án khác, phân tử DART™ hai đặc hiệu hoặc phân tử DART™ theo sáng chế có thể ức chế sự hoạt hoá của đích, ví dụ, tế bào tác động, bằng cách liên kết đồng thời và từ đó liên kết, thụ thể hoạt hoá và ức chế trên cùng một tế bào (ví dụ, liên kết với cả CD32A và CD32B, BCR và CD32B, hoặc IgERI và CD32B) như được nêu trên (xem phần Tình trạng kỹ thuật của sáng chế). Theo một khía cạnh khác của phương án này, DART™ hai đặc hiệu có thể biểu hiện tính chất kháng virus bằng cách liên kết đồng thời hai epitop trung hoà trên virus (ví dụ, epitop RSV; epitop WNV như E16 và E53).

## 2. Phân tử DART™ B7-H3 chung

Theo một phương án, phân tử DART™ hai đặc hiệu theo sáng chế có thể được xây dựng để gồm một miền liên kết epitop mà liên kết đặc hiệu với B7-H3 và miền liên kết epitop thứ hai liên kết đặc hiệu kháng nguyên không hoàn toàn, ví dụ isothioxyanat fluorescein (còn được gọi là floisothioxyanat hoặc FITC). DART™ như vậy dùng làm bộ điều hợp chung ("UDART™"), có thể nối đồng thời B7-H3 với các phân tử tương tác với các đoạn liên kết tiếp hợp với fluorescein kèm theo. Ví dụ, nhánh phản ứng FITC của DART™ có thể được sử dụng để liên kết với kháng thể được đánh dấu FITC

mà được liên kết với đích không phải B7-H3 liên quan đến sự tập hợp nội bào, làm mới nội bào, làm mới không tế bào, nhiều đích, v.v.. Phiên bản Fv chuột nhắt/Fc người thể khảm của Mab kháng fluorescein, 4420 có thể được sử dụng làm nguồn cho các miền CDR đặc hiệu FITC (Gruber, M. et al. (1994) "Efficient Tumor Cell Lysis Mediated By A Bispecific Single Chain Antibody Expressed In Escherichia coli", J. Immunol. 152(11): 5368-5374).

### 3. Phân tử DART™ B7-H3 đặc hiệu đích tế bào

Các phân tử DART™ hai đặc hiệu theo sáng chế đem lại các cơ hội độc nhất cho các loại tế bào đặc hiệu đích. Ví dụ, phân tử DART™ hai đặc hiệu hoặc phân tử DART™ có thể được xử lý kỹ thuật để bao gồm tổ hợp của các vị trí liên kết epitop mà nhận dạng tập kháng nguyên độc nhất đối với loại tế bào hoặc mô đích. Ngoài ra, khi một trong hai hoặc cả hai kháng nguyên riêng lẻ được tách ra khá phổ biến trong các loại mô và/hoặc tế bào khác, thì miền liên kết ái lực thấp có thể được sử dụng để xây dựng cấu trúc phân tử DART™ hoặc DART™. Miền liên kết ái lực thấp này sẽ không thể liên kết với từng epitop hoặc kháng nguyên riêng lẻ với đủ tổng ái lực cho mục đích trị liệu. Tuy nhiên, khi cả hai epitop hoặc kháng nguyên đều có mặt trên tế bào hoặc mô đích đơn lẻ, thì tổng ái lực của phân tử DART™ hoặc DART™ đối với tế bào hoặc mô này, so với tế bào hoặc mô chỉ biểu hiện một trong các kháng nguyên đó, sẽ gia tăng sao cho tế bào hoặc mô này có thể được hướng đích một cách hiệu quả theo sáng chế. Phân tử hai đặc hiệu này có thể có sự liên kết tăng cường với một hoặc cả hai kháng nguyên đích của nó trên tế bào biểu hiện cả hai kháng nguyên này so với DART™ một đặc hiệu hoặc kháng thể có độ đặc hiệu với chỉ một trong hai kháng nguyên.

Ví dụ, DART™ đặc hiệu B7-H3 theo sáng chế có thể được xây dựng cấu trúc để chứa miền mà là phối tử liên kết cho thụ thể nhóm diệt tự nhiên 2D (NKG2D). Thụ thể NKG2D được biểu hiện trên tất cả các tế bào diệt tự nhiên của người (và các động vật có vú khác) (Bauer, S. et al. (1999) "Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA", Science 285(5428):727-729; Jamieson, A.M. et al. (2002) "The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing", Immunity 17(1):19-29) as well as on all CD8<sup>+</sup> T cells (Groh, V. et al. (2001) "Costimulation Of CD8αβ T Cells By NKG2D Via Engagement By MIC

Induced On Virus-Infected Cells”, Nat. Immunol. 2(3):255-260; Jamieson, A.M. et al. (2002) “The Role Of The NKG2D Immunoreceptor In Immune Cell Activation And Natural Killing”, Immunity 17(1):19-29). Các phối tử liên kết này, và đặc biệt là các phối tử không được biểu hiện trên các tế bào bình thường, bao gồm phân tử tương thích mô 60 (H60), sản phẩm của gen 1 cảm ứng sớm axit retinoic (RAE-1), và thể phiên mã 1 giống protein liên kết UL16 (MULT1) (Raulet D.H. (2003) “Roles Of The NKG2D Immunoreceptor And Its Ligands”, Nature Rev. Immunol. 3:781-790; Coudert, J.D. et al. (2005) “Altered NKG2D Function In NK Cells Induced By Chronic Exposure To Altered NKG2D Ligand-Expressing Tumor Cells”, Blood 106:1711-1717). Các phối tử khác phản ứng với NKG2D người bao gồm các phân tử MICA và MICB liên quan đến lớp I của mạch MHC đa hình (Diefenbach, A. et al. (1999) “Natural Killer Cells: Stress Out, Turn On, Tune In”, Curr. Biol. 9(22):R851-R8533; Bauer, S. et al. (1999) “Activation Of NK Cells And T Cells By NKG2D, A Receptor For Stress-Inducible MICA”, Science 285(5428):727-729; Stephens, H.A. (2001) “MICA And MICB Genes: Can The Enigma Of Their Polymorphism Be Resolved?” Trends Immunol. 22:378-385. Trình tự của MICA là SEQ ID NO:66:

|            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|
| MGLGPVFLLL | AGIFPFAPPG | AAAEPHSLRY | NLTVLSWDGS |
| VQSGFLTEVH |            |            |            |
| LDGQPFLRCD | RQKCRAPQG  | QWAEDVLGNK | TWDRETRDLT |
| GNGKDLRMTL |            |            |            |
| AHIKDQKEGL | HSLQEIRVCE | IHEDNSTRSS | QHFYYDGELF |
| LSQNLETKEW |            |            |            |
| TMPQSSRAQT | LAMNVRNFLK | EDAMKTKTHY | HAMHADCLQE |
| LRRYLKSGVV |            |            |            |
| LRRTVPPMVN | VTRSEASEGN | ITVTCRASGF | YPWNITLSWR |
| QDGVSLSHDT |            |            |            |
| QQWGDVLPDG | NGTYQTWVAT | RICQGEEQRF | TCYMEHSGNH |
| STHPVPSGKV |            |            |            |

LVLQSHWQTF    HVSAVAAAAI    FVIIIIFYVRC    CKKKTSA AEG  
 PELVSLQVLD

QHPVGTSDHR DATQLGFQPL MSDLGSTGST EGA

Trình tự của MICB là SEQ ID NO:67:

PHSLRYNLMV    LSQDGSVQSG    FLAEGHLDGQ    PFLRYDRQKR  
 RAKPQGQWAE

DVLGAKTWDT    ETEDLTENGQ    DLRRTLTHIK    DQKGGLHSLQ  
 EIRVCEIHED

SSTRGSRHFY    YDGELFLSQN    LETQESTVPQ    SSRAQTLAMN  
 VTNFWKEDAM

KTKTHYRAMQ    ADCLQKLQLP    PMVNVICSEV    SEGKITVTCT  
 ASSFYPRNIT

LTWRQDGVSL    SHNTQQWGDV    LPDGNGTYQT    WVATRIRQGE  
 EQRFTCYMEH

SGNHGTHPVP    SGKALVLQSQ    RTDFPYVSAA    MPCFVIIIIL  
 CVPCKKKKTS

AAEGP

Theo cách khác, phân tử DART™ theo sáng chế có thể được xây dựng cấu trúc để chứa miền mà là phối tử liên kết cho thụ thể tế bào T (“TCR”) hoặc cho CD3 (đồng thụ thể tế bào T). TCR được biểu hiện tự nhiên bởi tế bào T CD4+ hoặc CD8+ và cho phép các tế bào này nhận dạng các peptit kháng nguyên được liên kết và trình diện bởi các protein MHC lớp I hoặc lớp II của tế bào trình diện kháng nguyên. Việc nhận dạng phức pMHC (peptit–MHC) bởi TCR làm khởi phát sự nhân lên của đáp ứng miễn dịch tế bào mà dẫn đến việc tạo ra xytokin và ly giải tế bào trình diện kháng nguyên (ví dụ, xem Armstrong, K.M. et al. (2008) “Conformational Changes And Flexibility In T-Cell Receptor Recognition Of Peptide–MHC Complexes”, *Biochem. J.* 415(Pt 2):183–196; Willemsen, R. (2008) “Selection Of Human Antibody Fragments Directed Against Tumor T-Cell Epitopes For Adoptive T-Cell Therapy”, *Cytometry A.* 73(11):1093-



1099; Beier, K.C. et al. (2007) “Master Switches Of T-Cell Activation And Differentiation”, *Eur. Respir. J.* 29:804-812; Mallone, R. et al. (2005) “Targeting T Lymphocytes For Immune Monitoring And Intervention In Autoimmune Diabetes”, *Am. J. Ther.* 12(6):534–550). CD3 là thụ thể liên kết với TCR (Thomas, S. et al. (2010) “Molecular Immunology Lessons From Therapeutic T-Cell Receptor Gene Transfer”, *Immunology* 129(2):170-177; Guy, C.S. et al. (2009) “Organization Of Proximal Signal Initiation At The TCR:CD3 Complex”, *Immunol. Rev.* 232(1):7-21; St. Clair, E.W. (Epub 2009 Oct 12) “Novel Targeted Therapies For Autoimmunity”, *Curr. Opin. Immunol.* 21(6):648-657; Baeuerle, P.A. et al. (Epub 2009 Jun 9) “Bispecific T-Cell Engaging Antibodies For Cancer Therapy”, *Cancer Res.* 69(12):4941-4944; Smith-Garvin, J.E. et al. (2009) “T Cell Activation”, *Annu. Rev. Immunol.* 27:591-619; Renders, L. et al. (2003) “Engineered CD3 Antibodies For Immunosuppression”, *Clin. Exp. Immunol.* 133(3):307-309).

Bằng cách xây dựng cấu trúc cho phân tử DART™ này để chứa cả ít nhất một miền liên kết epitop có khả năng liên kết với, ví dụ, thụ thể có mặt trên bề mặt của tế bào đích, thì phân tử DART™ này sẽ là phân tử DART™ và từ đó có khả năng liên kết với tế bào đích và nhờ đó khiến tế bào đích này biểu hiện phối tử liên kết cho thụ thể nhóm diệt tự nhiên 2D (NKG2D) hoặc TCR (bất cứ loại nào có mặt trên DART™ liên kết với tế bào đích) (ví dụ, xem Germain, C. et al. (2008) “Redirecting NK Cells Mediated Tumor Cell Lysis By A New Recombinant Bifunctional Protein”, *Prot. Engineer. Design Selection* 21(11):665-672). DART™ này có thể được sử dụng để đổi hướng tế bào đích mong muốn bất kỳ sang tế bào mà đích là ly giải tế bào qua trung gian tế bào NK hoặc gây độc tế bào qua trung gian tế bào T. Theo một phương án, miền liên kết epitop của DART™ có khả năng liên kết với thụ thể có mặt trên bề mặt của tế bào đích là epitop mà liên kết với kháng nguyên liên quan đến khối u để đổi hướng các tế bào ung thư như vậy sang cơ chất dùng để ly giải tế bào qua trung gian tế bào NK hoặc gây độc tế bào qua trung gian tế bào T. Đặc biệt quan tâm là kháng nguyên liên quan đến khối u mà là kháng nguyên ung thư vú, kháng nguyên ung thư buồng trứng, kháng nguyên ung thư tuyến tiền liệt, kháng nguyên ung thư cổ tử cung, kháng nguyên caxinom tuy, kháng nguyên ung thư phổi, kháng nguyên ung thư bàng quang, kháng nguyên ung thư ruột kết, kháng nguyên ung thư tinh hoàn, kháng nguyên ung thư u

nguyên bào xốp, kháng nguyên có liên quan đến u ác do tế bào B, kháng nguyên có liên quan đến đa u tủy, kháng nguyên có liên quan đến u bạch huyết không phải Hodgkins, hoặc kháng nguyên có liên quan đến bệnh bạch cầu lympho bào mãn tính.

Các kháng nguyên có liên quan đến khối u thích hợp để sử dụng như vậy bao gồm A33 (kháng nguyên caxinom đại trực tràng; Almqvist, Y. 2006, Nucl Med Biol. Nov;33(8):991-998); B1 (Egloff, A.M. et al. 2006, Cancer Res. 66(1):6-9); BAGE (Bodey, B. 2002 Expert Opin Biol Ther. 2(6):577-84); beta-catenin (Prange W. et al. 2003 J Pathol. 201(2):250-9); CA125 (Bast, R.C. Jr. et al. 2005 Int J Gynecol Cancer 15 Suppl 3:274-81); CD5 (Calin, G.A. et al. 2006 Semin Oncol. 33(2):167-73; CD19 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CD20 (Thomas, D.A. et al. 2006 Hematol Oncol Clin North Am. 20(5):1125-36); CD22 (Kreitman, R.J. 2006 AAPS J. 18;8(3):E532-51); CD23 (Rosati, S. et al. 2005 Curr Top Microbiol Immunol. 5;294:91-107); CD25 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CD27 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD28 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD36 (Ge, Y. 2005 Lab Hematol. 11(1):31-7); CD40/CD154 (Messmer, D. et al. 2005 Ann N Y Acad Sci. 1062:51-60); CD45 (Jurcic, J.G. 2005 Curr Oncol Rep. 7(5):339-46); CD56 (Bataille, R. 2006 Haematologica 91(9):1234-40); CD79a/CD79b (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48; Chu, P.G. et al. 2001 Appl Immunohistochem Mol Morphol. 9(2):97-106); CD103 (Troussard, X. et al. 1998 Hematol Cell Ther. 40(4):139-48); CDK4 (Lee, Y.M. et al. 2006 Cell Cycle 5(18):2110-4); CEA (carcinoembryonic antigen; Mathelin, C. 2006 Gynecol Obstet Fertil. 34(7-8):638-46; Tellez-Avila, F.I. et al. 2005 Rev Invest Clin. 57(6):814-9); CTLA4 (Peggs, K.S. et al. 2006 Curr Opin Immunol. 18(2):206-13); EGF-R (epidermal growth factor receptor; Adenis, A. et al. 2003 Bull Cancer. 90 Spec No:S228-32); Erb (ErbB1; ErbB3; ErbB4; Zhou, H. et al. 2002 Oncogene 21(57):8732-40; Rimon, E. et al. 2004 Int J Oncol. 24(5):1325-38); GAGE (GAGE-1; GAGE-2; Akcakanat, A. et al. 2006 Int J Cancer. 118(1):123-8); GD2/GD3/GM2 (Livingston, P.O. et al. 2005 Cancer Immunol Immunother. 54(10):1018-25); gp100 (Lotem, M. et al. 2006 J Immunother. 29(6):616-27); HER-2/neu (Kumar, Pal S et al. 2006 Semin Oncol. 33(4):386-91); human papillomavirus-E6/human papillomavirus-E7 (DiMaio, D. et al. 2006 Adv Virus Res. 66:125-59; KSA (17-1A) (Ragupathi, G.

2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); MAGE (MAGE-1; MAGE-3; (Bodey, B. 2002 *Expert Opin Biol Ther.* 2(6):577-84); MART (Kounalakis, N. et al. 2005 *Curr Oncol Rep.* 7(5):377-82; MUC-1 (Mathelin, C. 2006 *Gynecol Obstet Fertil.* 34(7-8):638-46); MUM-1 (Castelli, C. et al. 2000 *J Cell Physiol.* 182(3):323-31); N-acetylglucosaminyltransferase (Dennis, J.W. 1999 *Biochim Biophys Acta.* 6;1473(1):21-34); p15 (Gil, J. et al. 2006 *Nat Rev Mol Cell Biol.* 7(9):667-77); PSA (kháng nguyên đặc hiệu tuyến tiền liệt; Cracco, C.M. et al. 2005 *Minerva Urol Nefrol.* 57(4):301-11); PSMA (Ragupathi, G. 2005 *Cancer Treat Res.* 123:157-80); sTn (Holmberg, L.A. 2001 *Expert Opin Biol Ther.* 1(5):881-91); thụ thể TNF (thụ thể TNF- $\alpha$ , thụ thể TNF- $\beta$ ; hoặc thụ thể TNF- $\gamma$ ; van Horssen, R. et al. 2006 *Oncologist.* 11(4):397-408; Gardnerova, M. et al. 2000 *Curr Drug Targets.* 1(4):327-64); hoặc thụ thể VEGF (O'Dwyer, P.J. 2006 *Oncologist.* 11(9):992-8).

Các kháng nguyên có liên quan đến khối u khác để sử dụng như vậy (và các công bố bộc lộ các kháng thể phản ứng đặc hiệu đối với các kháng nguyên này) bao gồm ADAM-9 (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0172350; Công bố đơn PCT số WO 06/084075); ALCAM (Công bố đơn PCT số WO 03/093443); Carboxypeptidaza M (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0166291); CD46 (Patent Mỹ số 7,148,038; Công bố đơn PCT số WO 03/032814); Xytokeratin 8 (Công bố đơn PCT số WO 03/024191); thụ thể Ephrin (và đặc biệt là EphA2 (Patent Mỹ số 7,569,672; Công bố đơn PCT số WO 06/084226); Integrin Alpha-V-Beta-6 (Công bố đơn PCT số WO 03/087340); JAM-3 (Công bố đơn PCT số WO 06/084078); KID3 (Công bố đơn PCT số WO 05/028498); KID31 (Công bố đơn PCT số WO 06/076584); LUCA-2 (Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2006/0172349; Công bố đơn PCT số WO 06/083852); Oncostatin M (thụ thể Oncostatin Beta) (Patent Mỹ số 7,572,896; Công bố đơn PCT số WO 06/084092); PIPA (Patent Mỹ số 7,405,061; Công bố đơn PCT số WO 04/043239); ROR1 (Patent Mỹ số 5,843,749); và thụ thể Transferrin (Patent Mỹ số 7,572,895; Công bố đơn PCT số WO 05/121179).

Cũng đang được quan tâm là kháng nguyên đặc hiệu đối với các tác nhân lây nhiễm cụ thể, ví dụ, tác nhân virus bao gồm, nhưng không giới hạn ở virus suy giảm miễn dịch ở người (HIV), virus bệnh viêm gan B (HBV), virus cúm, virus papilom ở

người (HPV), virus chân và miệng (virus coxsackie), virus bệnh dại, virus ecpet đơn giả (HSV), và tác nhân gây viêm dạ dày ruột, bao gồm virus rotavirus, adenovirus, calicivirus, astrovirus và Norwalk virus; tác nhân vi khuẩn bao gồm, nhưng không giới hạn ở *E. coli*, *Salmonella thyphimurium*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Vibrio cholerae*, *Neisseria gonorrhoeae*, *Helicobacter pylori*, *Hemophilus influenzae*, *Shigella dysenteriae*, *Staphylococcus aureus*, *Mycobacterium tuberculosis* và *Streptococcus pneumoniae*, tác nhân nấm và tác nhân ký sinh như *Giardi*.

Theo một số phương án, phân tử theo sáng chế được xử lý kỹ thuật để bao gồm mô hình glycosyl hóa biến đổi hoặc glycoform biến đổi so với một phân tử tương đương của phân tử mẫu. Glycoform đã xử lý kỹ thuật có thể hữu dụng cho nhiều mục đích khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, làm tăng chức năng tác động. Glycoform đã xử lý kỹ thuật có thể được tạo ra bằng phương pháp bất kỳ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ bằng cách sử dụng chủng biểu hiện được xử lý kỹ thuật hoặc biến thể, bằng cách biểu hiện đồng thời với một hoặc nhiều enzym, ví dụ, *DI N-acetylglucosaminyltransferase III (GnTII1)*, bằng cách biểu hiện *DART™* theo sáng chế trong các sinh vật khác nhau hoặc các dòng tế bào từ các sinh vật khác nhau, hoặc bằng cách biến đổi (các) hydrat cacbon sau khi *DART™* đã được biểu hiện và tinh chế. Các phương pháp để tạo ra glycoform được xử lý kỹ thuật là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các phương pháp được bộc lộ trong tài liệu Umana et al. (1999) "Engineered Glycoforms Of An Antineuroblastoma IgG1 With Optimized Antibody-Dependent Cellular Cytotoxic Activity", *Nat. Biotechnol* 17:176-180; Davies et al. (2001) "Expression Of GnTIII In A Recombinant Anti-CD20 CHO Production Cell Line: Expression Of Antibodies With Altered Glycoforms Leads To An Increase In Adcc Through Higher Affinity For Fc Gamma RIII", *Biotechnol Bioeng* 74:288-294; Shields et al. (2002) "Lack Of Fucose On Human IgG1 N-Linked Oligosaccharide Improves Binding To Human Fc gamma RIII And Antibody-Dependent Cellular Toxicity", *J Biol Chem* 277:26733-26740; Shinkawa et al. (2003) "The Absence Of Fucose But Not The Presence Of Galactose Or Bisecting N-Acetylglucosamine Of Human IgG1 Complex-Type Oligosaccharides Shows The Critical Role Of Enhancing Antibody-Dependent Cellular Cytotoxicity", *J Biol Chem* 278:3466-3473) US 6,602,684; USSN 10/277,370; USSN 10/113,929; PCT

WO 00/61739A1; PCT WO 01/292246A1; PCT WO 02/311140A1; PCT WO 02/30954A1; công nghệ Potillegent™ (Biowa, Inc. Princeton, NJ); công nghệ xử lý kỹ thuật glycoform GlycoMAb™ (GLYCART biotechnology AG, Zurich, Switzerland); từng tài liệu được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn. Ví dụ, xem WO 00061739; EA01229125; US 20030115614; Okazaki et al. (2004) "Fucose Depletion From Human IgG1 Oligosaccharide Enhances Binding Enthalpy And Association Rate Between IgG1 And FcGammaRIIIA", JMB, 336: 1239-49 mỗi tài liệu này được kết hợp toàn bộ ở đây bằng cách viện dẫn.

Sáng chế còn bao gồm sự kết hợp của axit amin không tự nhiên để tạo ra DART™ theo sáng chế. Các phương pháp này là đã biết đối với người có hiểu biết trung bình về lĩnh vực kỹ thuật này như các phương pháp sử dụng cơ chế tổng hợp sinh học tự nhiên để cho phép kết hợp axit amin không tự nhiên vào protein, ví dụ, xem tài liệu Wang et al. (2002) "Expanding The Genetic Code", Chem. Comm. 1: 1-11; Wang et al. (2001) "Expanding The Genetic Code Of Escherichia coli", Science, 292: 498-500; van Hest et al. (2001) "Protein-Based Materials, Toward A New Level Of Structural Control," Chem. Comm. 19: 1897-1904, mỗi tài liệu này được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Chiến lược thay thế tập trung vào các enzym chịu trách nhiệm về quy trình tổng hợp sinh học amino axyl-tARN, ví dụ, xem tài liệu Tang et al. (2001) "Biosynthesis Of A Highly Stable Coiled-Coil Protein Containing Hexafluoroleucine In An Engineered Bacterial Host", J. Am. Chem. Soc. 123(44): 11089-11090; Kiick et al. (2001) "Identification Of An Expanded Set Of Translationally Active Methionine Analogues In Escherichia coli", FEBS Lett. 502(1-2):25-30; mỗi tài liệu này được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn. Theo một số phương án, sáng chế bao gồm các phương pháp biến đổi miền VL, VH hoặc Fc của phân tử theo sáng chế bằng cách thêm vào hoặc làm khuyết vị trí glycosyl hoá. Các phương pháp biến đổi hydrat cacbon của protein là đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và nằm trong phạm vi của sáng chế, xem tài liệu, e.g., Patent Mỹ số 6,218,149; EP 0 359 096 B1; Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số US 2002/0028486; WO 03/035835; Công bố đơn yêu cầu cấp patent Mỹ số 2003/0115614; Patent Mỹ số 6,218,149; Patent Mỹ số 6,472,511; tất cả các tài liệu này được kết hợp toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

## VIII. Phương pháp sử dụng chất điều biến B7-H3 và kháng thể kháng B7-H3 nhằm mục đích trị liệu

Kháng thể đơn dòng đối với B7-H3 có thể được sử dụng cho mục đích trị liệu ở cá thể mắc ung thư hoặc các bệnh khác. Liệu pháp dùng kháng thể kháng B7-H3 có thể bao gồm việc tạo phức hợp cả in vitro và in vivo như được mô tả ở trên. Theo một phương án, kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 có thể liên kết với và làm giảm quá trình tăng sinh các tế bào ung thư. Cần hiểu rằng kháng thể này được sử dụng ở nồng độ thúc đẩy sự liên kết trong các điều kiện sinh lý (ví dụ, in vivo). Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng đối với B7-H3 có thể được sử dụng cho liệu pháp miễn dịch định hướng ở tế bào ung thư của các mô khác nhau như ruột kết, phổi, vú, tuyến tiền liệt, buồng trứng, tụy, thận và các loại ung thư khác như sarcoma. Theo một phương án khác, một mình kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 có thể liên kết với và làm giảm sự phân chia ở tế bào ung thư. Theo một phương án khác, kháng thể đơn dòng kháng B7-H3 có thể liên kết với tế bào ung thư và làm chậm sự tiến triển của di căn. Theo một phương án khác nữa, cá thể có bệnh ung thư được cho điều trị giảm đau bằng kháng thể kháng B7-H3. Điều trị giảm đau cho cá thể ung thư bao gồm việc điều trị hoặc làm giảm các triệu chứng có hại của bệnh, hoặc các triệu chứng do điều trị bắt nguồn từ các liệu pháp điều trị khác được kê cho bệnh đó mà không ảnh hưởng trực tiếp đến sự tiến triển ung thư. Việc này bao gồm điều trị để làm giảm chứng đau, hỗ trợ dinh dưỡng, các vấn đề giới tính, suy kiệt tâm lý, trầm cảm, mệt mỏi, rối loạn tâm thần, buồn nôn, nôn, v.v..

Trong các trường hợp này, kháng thể kháng B7-H3 có thể được sử dụng với chất làm tăng cường hoặc định hướng đáp ứng miễn dịch của từng cá thể, như chất tăng cường ADCC.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng B7-H3 được tiếp hợp với hoặc có liên quan đến phân tử có hoạt tính phóng xạ, độc tố (ví dụ, calicheamixin), phân tử hoá trị, liposom hoặc các túi khác chứa hợp chất hoá trị và được dùng cho cá thể cần điều trị để hướng đích các hợp chất này đến tế bào ung thư chứa kháng nguyên được nhận dạng bởi kháng thể và từ đó loại bỏ tế bào ung thư hoặc tế bào mắc bệnh. Không bị giới hạn ở lý thuyết cụ thể bất kỳ, kháng thể kháng B7-H3 được thu nhận bởi tế bào mang B7-H3 ở bề mặt của nó, từ đó phân phối gốc tiếp hợp đến tế bào này để cảm ứng

tác dụng trị liệu. Theo một phương án khác nữa, kháng thể có thể được sử dụng làm liệu pháp hỗ trợ tại thời điểm cắt bỏ kháng nguyên biểu hiện ung thư bằng phẫu thuật để làm chậm sự tiến triển của di căn. Kháng thể này cũng có thể được dùng trước khi phẫu thuật (liệu pháp tân hỗ trợ ở cá thể có khối u biểu hiện kháng nguyên để làm giảm kích thước của khối u và từ đó cho phép hoặc đơn giản hóa phẫu thuật, dự trữ mô trong quá trình phẫu thuật và/hoặc làm giảm biến dạng hậu phẫu).

Việc định liều theo chu kỳ tế bào nằm trong thực tiễn của sáng chế. Theo các phương án này, chất hoá trị được sử dụng để đồng bộ chu kỳ tế bào của khối u hoặc các tế bào có bệnh đích khác ở giai đoạn định trước. Sau đó, tiến hành sử dụng kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế (một mình hoặc với gốc trị liệu bổ sung). Theo các phương án thay thế, kháng thể kháng B7-H3 được sử dụng để đồng bộ chu kỳ tế bào và làm giảm sự phân chia tế bào trước khi dùng chu kỳ điều trị thứ hai; chu kỳ thứ hai này có thể sử dụng kháng thể kháng B7-H3 và/hoặc gốc trị liệu bổ sung.

Chất hoá trị bao gồm phân tử có hoạt tính phóng xạ, độc tố, còn được gọi là độc tố tế bào hoặc chất gây độc tế bào, bao gồm chất bất kỳ gây hại đến khả năng sống của tế bào ung thư, chất và liposom hoặc các túi khác chứa hợp chất hoá trị. Các ví dụ về các chất hoá trị bao gồm nhưng không bị giới hạn ở 1-dehydrotestosteron, 5-flouraxil decarbazin, 6-mercaptopurin, 6-thioguanin, actinomycin D, adriamycin, aldesleukin, chất alkyl hoá, natri alopurinol, altretamin, amifostin, anastrozol, anthramycin (AMC)), chất chống giãn phân, xis-diclodiamin platin (II) (DDP) xisplatin), diaminodicloplatin, anthraxycin, kháng sinh, chất chống chuyển hóa, asparaginaza, BCG sống (trong bàng quang), betametason natri phosphat và betametason axetat, bicalutamit, bleomycin sulfat, busulfan, canxi leucouorin, calicheamixin, capecitabin, carboplatin, lomustin (CCNU), carmustin (BSNU), Clorambuxil, xisplatin, Cladribin, Colchixin, estrogen tiếp hợp, cyclophosphamit, xyclothosphamit, xytarabin, xytarabin, xytochallasin B, xytoxan, Dacarbazin, Dactinomycin, dactinomycin (trước đây là actinomycin), daunirubixin HCL, daunorubicin xitrat, denileukin diftitox, Dexrazoxan, Dibromomannitol, dihydroxyanthraxindion, Doxetaxel, dolasetronmesylat, doxorubicin HCL, dronabinol, E. coli L-asparaginaza, emetin, epoetin alpha, Erwinia L-asparaginaza, estrogen được este hóa, estradiol, estramustin phosphat natri, ethidi

bromua, ethinyl estradiol, etidronat, yếu tố etoposit xitrororum, etoposit phosphat, filgrastim, floxuridin, fluconazol, fludarabin phosphat, flouraxil, flutamit, axit folinic, gemxitabin HCL, glucocorticoit, goserelin axetat, gramixidin D, granisetron HCL, hydroxyure, idarubixin HCL, ifosfamid, interferon alpha-2b, irinotecan HCL, letrozol, leucovorin canxi, leuprolit axetat, levamisol HCL, lidocain, lomustin, maytansinoit, meclorethamin HCL, medroxyprogesteron axetat, megestrol axetat, melphalan HCL, mercaptopurin, mesna, methotrexat, metyltestosteron, mithramyxin, mitomycin C, mitotan, mitoxantron, nilutamit, octreotit axetat, ondansetron HCL, paclitaxel, pamidronat dinatri, pentostatin, pilocarpin HCL, plimyxin, polifeprosan 20 (với mảnh ghép carmustin), porfime natri, procain, procarbazin HCL, propranolol, rituximab, sargramostim, streptozotocin, tamoxifen, taxol, teniposit, tenoposit, testolacton, tetracain, thioepa clorambuxil, thioguanin, thiotepa, topotecan HCL, toremifen xitrat, trastuzumab, tretinoin, valrubixin, vinblastin sulfat, vincristin sulfat, and vinorelbin tartrat.

Theo một phương án được ưu tiên, độc tố tế bào đặc biệt hữu hiệu trong phân chia hoặc phân chia nhanh tế bào, sao cho các tế bào không phân chia tránh được một cách tương đối các tác động có độc.

Kháng thể theo sáng chế có thể được thu nhận trong tế bào mắc bệnh hoặc caxinom mà chúng liên kết với và do vậy đặc biệt hữu dụng cho các ứng dụng trị liệu, ví dụ, phân phối vào các độc tố tế bào cần được thu nhận đối với các hoạt tính có hại của chúng. Các ví dụ về độc tố như vậy bao gồm, nhưng không giới hạn ở, saporin, calicheamixin, auristatin và maytansinoit.

Kháng thể hoặc polypeptit theo sáng chế có thể được kết hợp (bao gồm được tiếp hợp hoặc được liên kết) với phân tử có hoạt tính phóng xạ, độc tố, hoặc các chất trị liệu khác, hoặc với liposom hoặc các túi khác chứa chất trị liệu cộng hoá trị hoặc không cộng hoá trị, trực tiếp hoặc gián tiếp. Kháng thể này có thể được liên kết với phân tử có hoạt tính phóng xạ, độc tố, hoặc phân tử hoá trị ở vị trí bất kỳ dọc theo kháng thể miễn là kháng thể đó có thể liên kết với B7-H3 đích của nó.

Độc tố hoặc chất hóa trị có thể được dùng đồng thời với (trước, sau, hoặc trong khi dùng), hoặc kết hợp (ví dụ, liên kết cộng hóa trị) với kháng thể đơn dòng thích hợp



trực tiếp hoặc gián tiếp (ví dụ, thông qua nhóm liên kết, hoặc, theo cách khác, thông qua phân tử liên kết với các vị trí gắn thích hợp, như phân tử cơ sở như được mô tả trong Patent Mỹ số 5,552,391). Độc tố và chất hóa trị theo sáng chế có thể được kết hợp trực tiếp với protein hướng đích cụ thể bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, phản ứng trực tiếp giữa một chất và kháng thể là có thể có khi mỗi trong số chất và kháng thể có phần tử thể có khả năng cho phản ứng với đối tượng còn lại. Ví dụ, nhóm ái nhân, như nhóm amino hoặc sulfhydryl, trên một trong số chất và kháng thể có thể có khả năng phản ứng với nhóm chứa cacbonyl, như anhydrit hoặc axit halogenua, hoặc với nhóm alkyl chứa nhóm rời chuyển tốt (ví dụ, halogenua) trên đối tượng còn lại.

Kháng thể hoặc polypeptit cũng có thể được liên kết với chất hoá trị qua chất mang cỡ micro. Thuật ngữ “chất mang cỡ micro” dùng để chỉ hạt dễ bị vi sinh vật phá hủy hoặc không dễ bị vi sinh vật phá hủy không tan trong nước và có kích thước nhỏ hơn khoảng 150  $\mu\text{m}$ , 120  $\mu\text{m}$  hoặc 100  $\mu\text{m}$  tính theo kích thước, tốt hơn là nhỏ hơn khoảng 50-60  $\mu\text{m}$ , tốt hơn nếu là nhỏ hơn khoảng 10, 5, 2,5, 2 hoặc 1,5  $\mu\text{m}$ . Chất mang cỡ micro bao gồm “chất mang cỡ nano”, là chất mang cỡ micro có kích thước nhỏ hơn khoảng 1  $\mu\text{m}$ , tốt hơn nếu nhỏ hơn khoảng 500 nm. Các hạt này là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất mang cỡ micro pha rắn có thể là các hạt được tạo ra từ polyme tương hợp sinh học có trong tự nhiên, polyme tổng hợp hoặc copolyme tổng hợp, mà có thể bao gồm hoặc không bao gồm chất mang cỡ micro được tạo ra từ agaroza hoặc agaroza liên kết ngang, cũng như các vật liệu dễ bị vi sinh vật phá hủy khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Chất mang cỡ micro pha rắn dễ bị vi sinh vật phá hủy có thể được tạo ra từ polyme dễ bị vi sinh vật phá hủy (ví dụ, poly(lactic axit), poly(axit glycolic) và copolyme của chúng) hoặc dễ bị ăn mòn (ví dụ, poly(orthoeste), như 3,9-diethyliden-2,4,8,10-tetraoxaspiro[5,5]undecan (DETOSU) hoặc poly(anhydrit), như poly(anhydrit) của axit sebacic) trong điều kiện sinh lý ở động vật có vú. Chất mang cỡ micro cũng có thể là pha lỏng (ví dụ, gốc dầu hoặc gốc lipid), như liposom, iscom (phức kích thích miễn dịch, mà là các phức ổn định của cholesteol và phospholipit, saponin có hoạt tính bổ trợ) không có kháng nguyên, hoặc các giọt nhỏ hoặc mixen được tìm thấy trong nhũ tương dầu trong nước hoặc nước trong dầu, miễn là chất mang cỡ micro pha lỏng này dễ bị vi sinh vật phá hủy. Chất mang cỡ micro pha lỏng dễ bị vi sinh vật

phá hủy thường kết hợp dầu dễ bị vi sinh vật phá hủy, một số loại đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm squalen và dầu thực vật. Các chất mang cỡ micro thường có dạng hình cầu, nhưng các chất mang cỡ micro có dạng khác hình cầu cũng được chấp nhận (ví dụ, dạng hình elip, dạng cần, v.v.). Do bản chất không tan của chúng (đối với nước), nên chất mang cỡ micro có thể lọc được từ nước và dung dịch gốc nước (chứa nước).

Thế tiếp hợp kháng thể hoặc polypeptit theo sáng chế có thể bao gồm chất liên kết hai chức chứa cả nhóm có khả năng liên kết với chất độc hoặc chất hoá trị và nhóm có khả năng liên kết với kháng thể. Chất liên kết có thể hoạt động như đoạn đệm để giữ khoảng cách giữa kháng thể với chất để tránh gây cản trở khả năng liên kết. Chất liên kết có thể phân tách được hoặc không phân tách được. Chất liên kết cũng có thể nhằm làm tăng tính phản ứng hoá học của phần tử thể trên chất hoặc kháng thể và từ đó tăng hiệu suất kết hợp. Sự gia tăng tính phản ứng hóa học cũng có thể thúc đẩy việc sử dụng các chất, hoặc các nhóm chức trên chất, mà theo cách khác sẽ không thể có. Chất liên kết hai chức có thể được kết hợp với kháng thể bằng phương tiện đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ, chất liên kết chứa gốc este hoạt tính, như N- hydroxysuccinimide, có thể được sử dụng để kết hợp với gốc lysin trong kháng thể thông qua liên kết amit. Theo một ví dụ khác, chất liên kết chứa gốc amin ái nhân hoặc hydrazin ái nhân có thể được kết hợp với các nhóm aldehyt sản xuất bởi phản ứng oxy hóa glycolytic của các gốc hydrat cacbon của kháng thể. Ngoài các phương pháp kết hợp trực tiếp này, chất liên kết còn có thể được kết hợp gián tiếp với kháng thể thông qua chất mang trung gian như aminodextran. Theo các phương án này, liên kết được biến đổi là thông qua lysin, hydrat cacbon, hoặc chất mang trung gian. Theo một phương án, liên kết này được kết hợp theo cách chọn lọc vị trí với gốc thiol tự do trong protein. Các gốc thích hợp để kết hợp chọn lọc với nhóm thiol trên các protein là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Ví dụ bao gồm hợp chất disulfua, hợp chất  $\alpha$ -halocarbonyl và  $\alpha$ -halocarboxyl và maleimide. Khi chức amin ái nhân có mặt trong cùng một phân tử như nhóm  $\alpha$ -halo carbonyl hoặc carboxyl, xuất hiện khả năng sẽ diễn ra sự đóng vòng thông qua quá trình alkyl hóa nội phân tử của amin. Các phương pháp để ngăn chặn vấn đề này là đã biết rõ đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách điều chế ra các phân tử trong đó chức amin và  $\alpha$ -halo được tách ra bởi nhóm

không linh hoạt, như nhóm aryl hoặc trans-alken, mà khiến sự đóng vòng không theo mong muốn không được ưu tiên về mặt hóa học lập thể. Ví dụ, xem Patent Mỹ số 6,441,163 về quy trình điều chế thể tiếp hợp của maytansinoit và kháng thể thông qua gốc disulfua một nửa.

Một trong số các chất liên kết dễ phân tách mà có thể được sử dụng để tạo ra thể liên hợp kháng thể-thuốc là chất liên kết không bền trong axit dựa trên axit cis-aconitic mà tận dụng môi trường axit của các thành phần nội bào khác nhau như endosom bị va chạm trong quá trình nhập bào qua trung gian thụ thể và tiêu bào. Ví dụ, xem trong tài liệu Shen, W.C. et al. (1981) ("cis-Aconityl Spacer Between Daunomycin And Macromolecular Carriers: A Model Of pH-Sensitive Linkage Releasing Drug From A Lysosomotropic Conjugate", *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 102:1048-1054 (1981)) về quy trình điều chế các thể tiếp hợp của daunorubicin với chất mang đại phân tử; Yang et al. (1988) ("Pharmacokinetics And Mechanism Of Action Of A Doxorubicin-Monoclonal Antibody 9.2.27 Conjugate Directed To A Human Melanoma Proteoglycan", *J. Natl. Canc. Inst.* 80:1154-1159) để điều chế thể tiếp hợp của daunorubicin với kháng thể chống ung thư hắc tố; Dillman et al. (1988) ("Superiority Of An Acid-Labile Daunorubicin-Monoclonal Antibody Immunoconjugate Compared To Free Drug", *Cancer Res.* 48:6097-6102) để sử dụng liên kết không bền trong axit theo cách tương tự để điều chế thể tiếp hợp của daunorubicin với kháng thể kháng tế bào T; và Trouet et al. (1982) "A Covalent Linkage Between Daunorubicin And Proteins That Is Stable In Serum And Reversible By Lysosomal Hydrolases, As Required For A Lysosomotropic Drug-Carrier Conjugate: In Vitro And In Vivo Studies", *Proc. Natl. Acad. Sci. (U.S.A.)* 79:626-629) để liên kết daunorubicin với kháng thể qua nhánh đoạn đệm peptit.

Kháng thể (hoặc polypeptit) theo sáng chế có thể được tiếp hợp (được liên kết) với phân tử có hoạt tính phóng xạ hoặc độc tố bằng phương pháp bất kỳ đã biết với lĩnh vực kỹ thuật này. Để thảo luận về các phương pháp đánh dấu phóng xạ cho kháng thể (xem *CANCER THERAPY WITH MONOCLONAL ANTIBODIES*, D.M. Goldenberg (Ed.) CRC Press, Boca Raton, 1995). Các độc tố thích hợp bao gồm taxan, maytansinoit, auristatin (ví dụ, monomethyl auristatin (MMAE), monomethyl auristatin F (MMAF),

auristatin E (AE), etc.) (như các độc tố được bộc lộ trong các patent Mỹ số 5,208,020; 5,416,064; 6,333,410; 6,340,701; 6,372,738; 6,436,931; 6,441,163; 6,596,757; 7,276,497; 7,585,857; or 7,851,432), calicheamixin, anthracyclin (ví dụ., doxorubixin), chất tương tự CC-1065, docetaxel, cathepsin B hoặc E; rixin, gelonin, ngoại độc tố *Pseudomonas*, độc tố bạch cầu, và ARNaza; tiuxetan hoặc đồng vị phóng xạ có độc (như  $^{90}\text{Y}$ ;  $^{131}\text{I}$ ,  $^{177}\text{Lu}$ ,  $^{186}\text{Re}$ ,  $^{188}\text{Re}$ ,  $^{211}\text{At}$ ,  $^{212}\text{Bi}$ ,  $^{213}\text{Bi}$ ,  $^{225}\text{Ac}$ , v.v.).

Theo cách khác, kháng thể có thể được tiếp hợp với kháng thể thứ hai để tạo ra thể tiếp hợp kháng thể khác loại như được nêu theo Patent Mỹ số 4,676,980. Sự tạo thành kháng thể liên kết ngang có thể hướng đích hệ miễn dịch đến các loại tế bào cụ thể, ví dụ, tế bào ung thư hoặc tế bào mắc bệnh biểu hiện B7-H3.

Sáng chế còn đề cập đến phương pháp làm chậm sự tiến triển của di căn ở cá thể mắc ung thư (bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư phổi, hoặc ung thư thận) bằng cách sử dụng kháng thể kháng B7-H3 hoặc các phương án khác mà liên kết với B7-H3 kết hợp với chất hoá trị, hoặc được liên kết với chất hoá trị. Theo một số phương án, kháng thể này là dạng được biến đổi giống như của người hoặc thể khảm của kháng thể kháng B7-H3 không phải của người.

Theo một phương án khác nữa, kháng thể này có thể được sử dụng làm liệu pháp hỗ trợ tại thời điểm cắt bỏ kháng nguyên biểu hiện ung thư bằng phẫu thuật để làm chậm sự tiến triển của di căn. Kháng thể hoặc kháng thể có liên quan đến chất hoá trị cũng có thể được sử dụng trước khi phẫu thuật (liệu pháp tân hỗ trợ) ở cá thể có khối u biểu hiện kháng nguyên để làm giảm kích thước của khối u và từ đó cho phép hoặc đơn giản hóa phẫu thuật, dự trữ mô trong quá trình phẫu thuật và/hoặc làm giảm sự biến dạng hậu phẫu.

Theo một phương án khác nữa, chế phẩm bất kỳ trong số chế phẩm liên kết B7-H3 được mô tả ở đây có thể liên kết với tế bào ung thư biểu hiện B7-H3 và cảm ứng đáp ứng miễn dịch có hoạt tính kháng tế bào ung thư biểu hiện B7-H3. Trong một số trường hợp, đáp ứng miễn dịch có hoạt tính có thể gây chết tế bào ung thư (ví dụ, kháng thể liên kết với tế bào ung thư cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình), hoặc ức chế quá trình sinh trưởng (ví dụ, ngăn chặn sự tiến triển của chu kỳ tế bào) của tế bào ung thư. Trong các trường hợp khác, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể mới được mô

tả ở đây có thể liên kết với tế bào ung thư và tính gây độc tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC) có thể loại bỏ tế bào ung thư mà kháng B7-H3 liên kết với. Do đó, sáng chế đề cập đến phương pháp kích thích đáp ứng miễn dịch bao gồm việc sử dụng chế phẩm bất kỳ trong số các chế phẩm được mô tả ở đây.

Trong một số trường hợp, kháng thể liên kết cũng có thể hoạt hoá cả đáp ứng miễn dịch tế bào và mô và lấy thêm nhiều tế bào diệt tự nhiên hơn hoặc gia tăng sản lượng xytokin (ví dụ, IL-2, IFN-gama, IL-12, TNF-alpha, TNF-beta, v.v.) mà còn hoạt hoá hệ miễn dịch của cá thể để phá hủy các tế bào ung thư. Theo một phương án khác nữa, kháng thể kháng B7-H3 có thể liên kết với tế bào ung thư và đại thực bào hoặc các tế bào thực khuẩn khác có thể opsonin hóa tế bào ung thư.

Các chế phẩm khác nhau của kháng thể kháng B7-H3 hoặc các mảnh của chúng có thể được sử dụng để dùng. Theo một số phương án, kháng thể kháng B7-H3 hoặc các mảnh của chúng có thể được sử dụng nguyên vẹn. Ngoài chất hoạt được, chế phẩm theo sáng chế cũng có thể chứa chất mang được dùng thích hợp bao gồm tá dược và chất hỗ trợ mà đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này và là các chất tương đối trợ tạo điều kiện cho việc sử dụng chất hữu hiệu về mặt dược lý hoặc tạo điều kiện cho việc xử lý chất hoạt được thành chế phẩm mà có thể được sử dụng dược lý để phân phối đến vị trí tác động. Ví dụ, tá dược có thể tạo hình hoặc độ đặc, hoặc đóng vai trò làm chất làm loãng. Các tá dược thích hợp bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các chất ổn định, chất thẩm ướt và chất nhũ hóa, muối để làm thay đổi độ thẩm thấu, chất bao, chất đệm và chất tăng cường thẩm thấu vào da.

Các chế phẩm thích hợp để dùng ngoài đường tiêu hoá bao gồm dung dịch chứa nước của hợp chất hoạt tính ở dạng tan trong nước, ví dụ, muối tan trong nước. Ngoài ra, hỗn dịch chứa hợp chất hoạt tính với lượng thích hợp dùng cho hỗn dịch tiêm chứa dầu có thể được sử dụng. Các dung môi ưa chất béo hoặc chất dẫn thuốc thích hợp bao gồm dầu béo, ví dụ, dầu vừng, hoặc este của axit béo tổng hợp, ví dụ, etyl oleat hoặc triglycerit. Hỗn dịch tiêm chứa nước có thể chứa các chất làm tăng độ nhớt của hỗn dịch và bao gồm, ví dụ, natri carboxymethyl xenluloza, sorbitol và/hoặc dextran. Tùy chọn, hỗn dịch này có thể còn chứa chất làm ổn định. Liposom cũng có thể được sử dụng để bao nang chất để phân phối vào tế bào.

Dược phẩm để dùng toàn thân theo sáng chế có thể được bào chế để dùng qua đường ruột, ngoài đường tiêu hoá hoặc tại chỗ. Thực vậy, cả ba loại chế phẩm này có thể được sử dụng đồng thời để đạt được mục đích sử dụng toàn thân thành phần hoạt tính. Tá dược cũng như chế phẩm để phân phối thuốc ngoài đường tiêu hoá và không ngoài đường tiêu hoá được nêu trong tài liệu REMINGTON: THE SCIENCE AND PRACTICE OF PHARMACY, 21st Edition, Lippincott Williams & Wilkins Publishing (2005). Các chế phẩm thích hợp để dùng qua đường miệng bao gồm viên nang gelatin cứng hoặc mềm, viên tròn, viên nén, bao gồm viên nén được bao, cốm ngọt, hỗn dịch, sirô hoặc thuốc xông hít và các dạng giải phóng có kiểm soát của chúng. Nói chung, các chất này được phối trộn để dùng bằng cách tiêm {ví dụ, trong bụng, qua đường tĩnh mạch, dưới da, trong dịch nhầy, v.v.}, mặc dù các đường dùng khác (ví dụ, miệng, niêm mạc, v.v.) có thể cũng được sử dụng. Do đó, kháng thể kháng B7-H3 tốt hơn nếu được kết hợp với chất dẫn thuốc được dùng như nước muối, dung dịch Ringger, dung dịch dextroza và dạng tương tự.

Chế độ liều lượng cụ thể, tức là liều dùng, thời gian và lặp lại, sẽ phụ thuộc vào cá nhân cụ thể và tiền sử y tế của cá thể. Nói chung, liều bằng ít nhất khoảng 100 µg/kg thể trọng, tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 250 µg/kg thể trọng, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 750 µg/kg thể trọng, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 3 mg/kg thể trọng, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 5 mg/kg thể trọng, thậm chí tốt hơn nữa nếu ít nhất khoảng 10mg/kg thể trọng được sử dụng.

Các vấn đề cần cân nhắc dựa trên kinh nghiệm, như thời gian bán rã, thường sẽ góp phần xác định liều lượng này. Kháng thể, tương thích với hệ miễn dịch của người, như kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể của người hoàn toàn, có thể được sử dụng để kéo dài thời gian bán rã của kháng thể và ngăn chặn việc kháng thể bị tấn công bởi hệ miễn dịch của vật chủ. Tần suất dùng có thể được xác định và được điều chỉnh theo chu trình trị liệu và là dựa trên việc làm giảm số lượng tế bào ung thư, duy trì việc làm giảm tế bào ung thư này, làm giảm sự tăng sinh của tế bào ung thư, hoặc làm chậm sự tiến triển của di căn. Theo cách khác, chế phẩm giải phóng duy trì liên tục chứa kháng thể kháng B7-H3 có thể là thích hợp. Các chế phẩm và thiết bị khác nhau để có được sự phát phóng duy trì là đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Theo một phương án, liều lượng kháng thể kháng B7-H3 có thể được xác định theo kinh nghiệm ở cá thể đã trải qua một hoặc nhiều lần dùng. Cá thể được cho dùng liều tăng dần chứa kháng thể kháng B7-H3. Để đánh giá hiệu quả của kháng thể kháng B7-H3, chỉ thị của bệnh ung thư cụ thể có thể được theo dõi. Các chỉ thị này bao gồm các phương pháp trực tiếp kích thích khối u thông qua bắt mạch hoặc quan sát bằng mắt thường, phương pháp xác định gián tiếp kích thích khối u bằng kỹ thuật chụp hình tia x hoặc kỹ thuật chụp hình khác; mức độ cải thiện như được đánh giá bởi sinh thiết khối u trực tiếp và kiểm tra bằng kính hiển vi mẫu khối u; xác định chỉ thị khối u gián tiếp (ví dụ, PSA đối với bệnh ung thư tuyến tiền liệt), sự giảm đau hoặc giảm bại liệt; cải thiện khả năng nói, nhìn, thở hoặc khuyết tật khác có liên quan đến khối u; tăng cảm giác ngon miệng; hoặc tăng chất lượng cuộc sống như xác định được bởi các thử nghiệm được chấp nhận hoặc kéo dài sự sống. Sẽ rõ ràng đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này rằng liều lượng sẽ thay đổi phụ thuộc vào cá thể, loại ung thư, giai đoạn ung thư, liệu bệnh ung thư đã bắt đầu di căn đến vị trí khác ở cá thể hay chưa và các điều trị trong quá khứ và đang được sử dụng.

Chế phẩm khác chứa dạng phân phối thích hợp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất mang như liposom. Ví dụ, xem tài liệu Mahato et al. (1997) "Cationic Lipid-Based Gene Delivery Systems: Pharmaceutical Perspectives", Pharm. Res. 14:853-859. Chế phẩm chứa hạt mỡ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, xytofectin, túi nhiều lớp và túi một lớp.

Theo một số phương án, nhiều hơn một kháng thể có thể có mặt. Kháng thể có thể là đơn dòng hoặc đa dòng. Chế phẩm này có thể chứa ít nhất một, ít nhất hai, ít nhất ba, ít nhất bốn, ít nhất năm kháng thể khác nhau mà có thể phản ứng chống lại caxinom, caxinom tuyến, bệnh sacom, hoặc bệnh sacom tuyến. Kháng thể kháng B7-H3 có thể được trộn với một hoặc nhiều kháng thể có phản ứng chống lại caxinom, caxinom tuyến, bệnh sacom, hoặc bệnh sacom tuyến trong các cơ quan bao gồm, nhưng không giới hạn ở, buồng trứng, vú, phổi, tuyến tiền liệt, ruột kết, thận, da, tuyến giáp, xương, ống tiêu hoá trên và tụy. Theo một phương án, hỗn hợp của các kháng thể kháng B7-H3 khác nhau được sử dụng. Hỗn hợp của các kháng thể, như chúng thường được nêu trong lĩnh vực kỹ thuật này, có thể đặc biệt hữu dụng để điều trị cho phạm vi quần thể cá thể rộng

hơn.

### Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế đã được mô tả tổng quát, sáng chế này sẽ dễ hiểu hơn thông qua việc tham khảo các ví dụ dưới đây được nêu bằng cách minh họa và không được dự định là làm giới hạn phạm vi của sáng chế trừ khi có quy định cụ thể.

#### Ví dụ 1

##### Đánh giá độ tương thích hóa mô miễn dịch

Nhóm gồm 49 mAb được tạo ra từ bước tạo miễn dịch tế bào u/tế bào phôi thai nguyên bản. Các kháng thể được đánh giá về khả năng của chúng trong việc biểu hiện sự nhuộm IHC biệt hóa mô khối u so với mô bình thường không ung thư, khả năng sử dụng kháng thể hiệu quả trong mô hình động vật linh trưởng (và đặc biệt là khỉ đuôi dài), mức ái lực và độ đặc hiệu kháng nguyên và mức hoạt tính điều biến miễn dịch tính và thu nhận tế bào. 21 mAb được nhận diện từ đầu bởi phân tích MS và/hoặc liên kết với tế bào B7-H3-CHO. 28 mAb còn lại được nhận diện bằng cách sàng lọc thư viện bằng ELISA bằng protein B7-H3. Các đặc tính của 46 trong 49 thành viên của nhóm này được nêu trong Bảng 2.

| <b>Bảng 2</b> |               |            |                     |                     |                     |                               |                                                            |
|---------------|---------------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|------------------------------------------------------------|
| <b>Tên</b>    | <b>Isotyp</b> | <b>IHC</b> | <b>ATCC<br/>Dãy</b> | <b>Thu<br/>nhận</b> | <b>U-<br/>DART™</b> | <b>BIACORE™<br/>Phân tích</b> | <b>B7-H3<br/>của khỉ<br/>đuôi<br/>dài<br/>Liên<br/>kết</b> |
| BRCA84D       | IgG1/k        | 2a         | 2                   | +                   | +                   | +                             | ++                                                         |
| TDH6          | IgG1/k        | 2a         | 1                   | +                   | +                   | +/-                           | +                                                          |
| TES7          | IgG1/k        | 2a         | 1                   | +                   | +                   | +                             | -                                                          |
| BRCA68D       | IgG1/k        | 2b         | 3                   | +                   | +                   | ++                            | ++                                                         |
| BRCA69D       | IgG1/k        | 2b         | 3                   | +                   | +                   | ++                            | ++                                                         |
| GB8           | IgG1/k        | 2b         | 3                   | +                   | +                   | +                             | ++                                                         |
| SG27          | IgG2b/k       | 2b         | 1                   |                     | +                   | +                             | +                                                          |
| OVCA22        | IgG1/k        | 2c         | 3                   | +                   | +                   | +/-                           | +                                                          |
| PRCA157       | IgG1/k        | 2c         | 2                   | +                   | +                   |                               | ++                                                         |
| BLA8          | IgG1/k        | 2c         |                     | +/-                 | +                   | ++                            | ++                                                         |
| KID35         | IgG1/k        | 2c         | 2                   |                     |                     |                               | ++                                                         |
| LUCA50        | IgG2a/k       | 2c         | 1                   |                     |                     | +                             | ++                                                         |
| OVCA21        | IgG1/k        | 2c         | 1                   |                     | +                   | +                             | +                                                          |



| <b>Bảng 2</b> |               |            |                     |                     |                     |                               |                                                        |
|---------------|---------------|------------|---------------------|---------------------|---------------------|-------------------------------|--------------------------------------------------------|
| <b>Tên</b>    | <b>Isotyp</b> | <b>IHC</b> | <b>ATCC<br/>Dãy</b> | <b>Thu<br/>nhận</b> | <b>U-<br/>DART™</b> | <b>BIACORE™<br/>Phân tích</b> | <b>B7-H3<br/>của khối<br/>đau dài<br/>Liên<br/>kết</b> |
| PRCA135       | IgG1/k        | 2c         | 3                   |                     | +                   |                               | ++                                                     |
| SG24          | IgG2a/k       | 2c         | 3                   |                     |                     | ++                            | ++                                                     |
| TDH5          | IgG1/k        | 2c         | 3                   |                     | +                   | ++                            | ++                                                     |
| BCCA66        | IgG1/k        | 2c         | 2                   |                     | +                   |                               | -                                                      |
| RECA13        | IgG1/k        | 2c         | 3                   |                     | +                   |                               | -                                                      |
| RECA9         | IgG1/k        | 2c         | 3                   |                     | +                   |                               | -                                                      |
| PRCA123       | IgG1/k        | 2c/3       | 3                   |                     | +                   |                               | ++                                                     |
| BRCA126       | IgG1/k        | 3/F        |                     |                     |                     |                               |                                                        |
| BRCA192       | IgG1/k        | 3/F        |                     |                     |                     |                               |                                                        |
| BRCA34        | IgG1/k        | 3/F        |                     |                     |                     |                               |                                                        |
| KID1          | IgG1/k        | 3/F        | ND                  | +                   | +                   |                               | +                                                      |
| KID13         | IgG2a/k       | 3/F        | 3                   |                     |                     |                               | ++                                                     |
| LU14          | IgG2b/k       | 3/F        |                     |                     |                     |                               | -                                                      |
| LUCA1         | IgG1/k        | 3/F        | 1                   | +                   | +                   | ++                            | ++                                                     |
| MCLY42        | IgG2a/k       | 3/F        |                     |                     |                     |                               | ++                                                     |
| MCLY46        | IgG1/k        | 3/F        |                     |                     |                     |                               | ++                                                     |
| OVCA40        | IgG1/k        | 3/F        |                     |                     |                     |                               | ++                                                     |
| PA20          | IgG1/k        | 3/F        |                     | +                   |                     | ++                            | -                                                      |
| PA40          | IgG2b/k       | 3/F        | 3                   |                     |                     |                               | -                                                      |
| PA41          | IgG1/k        | 3/F        | 3                   |                     |                     |                               |                                                        |
| PRO6          | IgG1/k        | 3/F        | 2                   |                     |                     |                               | -                                                      |
| RECA22        | IgG1/k        | 3/F        | 3                   |                     | -                   |                               | +                                                      |
| SAL3          | IgG2a/k       | 3/F        |                     |                     | +++                 |                               | ++                                                     |
| SG20          | IgG1/k        | 3/F        |                     |                     |                     |                               | +                                                      |
| SG29          | IgG1/k        | 3/F        |                     |                     |                     |                               | ++                                                     |
| SKIN2         | IgG1/k        | 3/F        | 3                   |                     | +++                 |                               | ++                                                     |
| STO5          | IgG2b/k       | 3/F        | 3                   |                     | ++                  |                               | +                                                      |
| TDH36         | IgG1/k        | 3/F        | 2                   |                     |                     |                               | ++                                                     |
| TDH37         | IgG1/k        | 3/F        | 3                   |                     |                     |                               | +                                                      |
| TDH4          | IgG1/k        | 3/F        |                     |                     | +++                 | ++                            | ++                                                     |
| TDH40         | IgG2b/k       | 3/F        | 3                   |                     |                     |                               | ++                                                     |
| TDH44         | IgG2b/k       | 3/F        |                     |                     |                     |                               | ++                                                     |
| OVCA25        | IgG1/k        | 3/F        | 3                   |                     |                     |                               | +                                                      |

Kết quả nhuộm IHC đã khẳng định rằng nhóm bao gồm các kháng thể tạo ra sự biệt hóa liên kết mạnh giữa khối u với mô bình thường trong nhiều kháng thể được nhận diện, biểu hiện hàng loạt đặc tính liên kết bởi phân tích BIACORE™, biểu hiện tính

phản ứng với hàng loạt epitop trùng lặp và không trùng lặp và biểu hiện hàng loạt tính đặc hiệu đối với B7-H3 4Ig so với 2Ig. Các đặc tính của chín ứng viên tốt nhất được thể hiện trong Bảng 3 và Bảng 4.

| <b>Bảng 3</b>        |                                                       |                         |                     |                                |                   |
|----------------------|-------------------------------------------------------|-------------------------|---------------------|--------------------------------|-------------------|
| <b>Tên</b>           | <b>Mô thường</b>                                      | <b>Ung thư ruột kết</b> | <b>Ung thư phổi</b> | <b>Ung thư tuyến tiền liệt</b> | <b>Ung thư vú</b> |
| <b>BRCA84D</b>       | Ruột kết 1+<br>Phổi 1+<br>Gan 1+                      | 1231<br>*               | 1130                | 112                            | 1111              |
| <b>TDH6</b>          | Ruột kết 1+<br>Tụy 1+<br>Thận 1+<br>Phổi 1+<br>Gan 1+ | 1110<br>*               | 1010                | 111                            | 1011              |
| <b>TES7</b>          |                                                       | 1,5                     | 1,75                | 3                              | 3                 |
| <b>BRCA68D</b>       | Tụy 1+<br>Thận 1+<br>Phổi 1+<br>Gan 2+                | 2321<br>*               | 3332                | 333                            | 3333              |
| <b>BRCA69D</b>       | Ruột kết 1+<br>Tụy 1+<br>Thận 1+<br>Gan 1+            | 2231<br>*               | 3231                | 333                            | 3333              |
| <b>GB8</b>           |                                                       |                         |                     |                                |                   |
| <b>SG27</b>          | Ruột kết 1+<br>Tụy 1+<br>Thận 1+<br>Gan 1+            | 1221<br>*               | 1120                | 222                            | 1122              |
| <b>OVCA22</b>        | Ruột kết 2+<br>Tụy 2+<br>Gan 2+                       | 1122                    | 3131<br>**          | 222                            | 3233              |
| <b>PRCA157</b>       | Ruột kết 2+<br>Gan 2+<br>Da 2+                        | 2231<br>*               | 3231                | 333                            | 2333              |
| * cả +str; ** str 3+ |                                                       |                         |                     |                                |                   |

| <b>Bảng 4</b>  |                                |                    |
|----------------|--------------------------------|--------------------|
| <b>Tên</b>     | <b>2Ig/4Ig<br/>Độ đặc hiệu</b> | <b>Nhóm epitop</b> |
| <b>BRCA84D</b> | 4Ig/2Ig                        | 1                  |
| <b>TDH6</b>    | 4Ig/2Ig                        | 2                  |
| <b>TES7</b>    | 4Ig                            | 3                  |
| <b>BRCA68D</b> | 4Ig/2Ig                        | 4                  |

|                |         |   |
|----------------|---------|---|
| <b>BRCA69D</b> | 4Ig/2Ig | 4 |
| <b>GB8</b>     | 4Ig/2Ig | 5 |
| <b>SG27</b>    | 4Ig/2Ig | 6 |
| <b>OVCA22</b>  | 4Ig     | 7 |
| <b>PRCA157</b> | 4Ig/2Ig | 8 |

Bảng 5 là bảng tóm tắt về profin hoạt tính của các kháng thể này.

| <b>Bảng 5</b>                                        |                             |                                    |                             |                                        |              |                          |                          |
|------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------|-----------------------------|----------------------------------------|--------------|--------------------------|--------------------------|
| <b>Tên</b>                                           | <b>Bình thường Mô Nhuộm</b> | <b>Khối u/bình thường Biệt hóa</b> | <b>Khối u Mô Dương tính</b> | <b>Khí đuôi dài chéo Tính phản ứng</b> | <b>IHC *</b> | <b>Liên kết BIACORE™</b> | <b>UDAR T™ Hoạt tính</b> |
| <b>BRCA84D</b>                                       | 1                           | 1                                  | Khối u Mô đệm bv            | Dương tính (không 1:1)                 | 78           | ++                       | ++                       |
| <b>TES7</b>                                          | 1                           | 1                                  | Khối u Mô đệm bv            | âm tính                                | 1250         | +                        | ++                       |
| <b>BRCA68D</b>                                       | 3                           | 3                                  | Khối u                      | Dương tính (1:1)                       | 20           | +++                      | ++                       |
| <b>BRCA69D</b>                                       | 3                           | 3                                  | Khối u Mô đệm               | Dương tính (1:1)                       | 20           | +++                      | ++                       |
| <b>GB8</b>                                           | 2/3 (ND thượng thận)        | 3/4                                | Khối u Mô đệm               | ND, + tái tổ hợp                       | 625          | +                        | +                        |
| <b>SG27</b>                                          | 2/3                         | ND                                 | ND                          | ND, + tái tổ hợp                       | 20000        | +                        | +                        |
| <b>OVCA22</b>                                        | 1                           | 1                                  | Khối u Mô đệm               | Âm tính + tái tổ hợp                   | 2500         | +                        | ++                       |
| <b>PRCA157</b>                                       | 2                           | 3                                  | Khối u Mô đệm bv            | Dương tính (1:1)                       | 20           | ND                       | ++                       |
| * nồng độ tối ưu tính theo ng/mL; ND, không xác định |                             |                                    |                             |                                        |              |                          |                          |

Phân tích về hoạt tính của kháng thể được thể hiện trong Bảng 6 cho thấy rằng profin tương ứng của chúng khác nhau và mỗi kháng thể có liên quan đến cả ưu điểm và nhược điểm so với nhau (Bảng 6).

| <b>Bảng 6</b>    |                                                                                                                                                                           |                                                                      |
|------------------|---------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----------------------------------------------------------------------|
| <b>Kháng thể</b> | <b>Ưu điểm</b>                                                                                                                                                            | <b>Nhược điểm</b>                                                    |
| <b>BRCA84D</b>   | #1 Nhuộm mô bình thường<br>#1 Biệt hóa khối u/bình thường<br>Nhuộm khối u, mô đệm, BV<br>Vị trí liên kết độc nhất, ái lực trung bình (liên kết chuẩn độ được)             | Tính phản ứng chéo của khi đuôi dài không phải 1:1                   |
| <b>BRCA68D</b>   | #3 Nhuộm mô bình thường<br>#3 Biệt hóa khối u/bình thường<br>Tính phản ứng chéo ở khi đuôi dài là 1:1<br>Ái lực cao<br>Hoạt tính UDART™ tiềm năng                         | Chỉ nhuộm khối u                                                     |
| <b>BRCA69D</b>   | #3 Nhuộm mô bình thường<br>#3 Biệt hóa khối u/bình thường<br>Tính phản ứng chéo ở khi đuôi dài là 1:1<br>Nhuộm khối u, mô đệm<br>Ái lực cao<br>Hoạt tính UDART™ tiềm năng |                                                                      |
| <b>PRCA157</b>   | #2 Nhuộm mô bình thường<br>#3 Biệt hóa khối u/bình thường<br>Tính phản ứng chéo ở khi đuôi dài là 1:1<br>Nhuộm khối u, mô đệm, BV<br>Hoạt tính UDART™ tiềm năng           | BIACORE™                                                             |
| <b>TES7</b>      | #1/2 Nhuộm mô bình thường<br>#1/2 biệt hóa khối u/bình thường<br>Nhuộm khối u, mô đệm, BV<br>Đặc hiệu 4Ig<br>Hoạt tính UDART™ tiềm năng                                   | Không có tính phản ứng chéo ở khi đuôi dài<br>Ái lực thấp            |
| <b>OVCA22</b>    | #1/2 Nhuộm mô bình thường<br>#1/2 Biệt hóa khối u/mô ái lực thấp<br>Nhuộm khối u, mô đệm<br>Đặc hiệu 4Ig<br>Hoạt tính UDART™ tiềm năng                                    | Không có tính phản ứng chéo ở khi đuôi dài<br>Ái lực thấp            |
| <b>GB8</b>       | #2/3 nhuộm mô bình thường (thượng thận không được xác định)<br>#3/4 biệt hóa khối u/bình thường<br>Nhuộm khối u, mô đệm<br>Hoạt tính UDART™ vừa phải                      | Tính phản ứng chéo ở khi đuôi dài không được xác định<br>Ái lực thấp |
| <b>SG27</b>      | #2/3 Nhuộm mô bình thường<br>Biệt hóa khối u/bình thường không được xác định<br>Hoạt tính UDART™ vừa phải                                                                 | Tính phản ứng chéo ở khi đuôi dài không được xác định<br>Ái lực thấp |

Vì BRCA84D, BRCA68D, BRCA69D và PRCA157 biểu hiện profin IHC của mô hình thường sạch hơn, sự biệt hóa IHC của khối u/bình thường mạnh hơn, liên kết

từ vừa đến mạnh (BIAcore™/IHC), tính phản ứng chéo với B7-H3 của khi đuôi dài và hoạt tính UDART™ tiềm năng, nên các kháng thể loài này được chọn để phát triển thêm. Các kháng thể này khác với TES7 and OVCA2, mà biểu hiện ái lực thấp (trong thử nghiệm BIAcore™), và không có tính phản ứng chéo với B7-H3 của khi đuôi dài. Các kháng thể này khác với SG27, mà biểu hiện ái lực thấp (trong thử nghiệm BIAcore™), tính năng IHC kém (liên kết yếu) và hoạt tính UDART™ thấp hơn. Các kháng thể này khác với GB8, mà biểu hiện ái lực thấp (trong thử nghiệm BIAcore™), sự biệt hóa IHC của khối u/bình thường kém, và hoạt tính UDART™ thấp hơn.

Bằng cách sử dụng tế bào đối chứng dương Caki-2 và Hs700T, nghiên cứu IHC cho thấy rằng mỗi trong các kháng thể biểu hiện nồng độ tối ưu khác nhau và nồng độ biệt hóa khác nhau so với một kháng thể khác (Bảng 7).

| <b>Bảng 7</b>                                                                                                                                                     |                           |       |                             |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|---------------------------|-------|-----------------------------|
| <b>Kháng thể</b>                                                                                                                                                  | <b>Nồng độ IHC tối ưu</b> |       | <b>Nồng độ IHC biệt hóa</b> |
| <b>BRCA84D</b>                                                                                                                                                    | 0,625                     | µg/mL | 0,078 µg/mL                 |
| <b>BRCA68D</b>                                                                                                                                                    | 0,156                     | µg/mL | 0,0195 µg/mL                |
| <b>BRCA69D</b>                                                                                                                                                    | 0,156                     | µg/mL | 0,0195 µg/mL                |
| <b>PRCA157</b>                                                                                                                                                    | 0,078                     | µg/mL | 0,0195 µg/mL                |
| <b>TES7</b>                                                                                                                                                       | 5                         | µg/mL | 1,25 µg/mL                  |
| <b>OVCA22</b>                                                                                                                                                     | 10                        | µg/mL | 2,5 µg/mL *                 |
| <b>GB8</b>                                                                                                                                                        | 1,25                      | µg/mL | 0,625 µg/mL                 |
| <b>SG27</b>                                                                                                                                                       | 20                        | µg/mL | Không xác định **           |
| <b>TDH6</b>                                                                                                                                                       | 20                        | µg/mL | Không xác định ***          |
| * OVCA22 chỉ thể hiện sự liên kết với tế bào caki2, không thể hiện sự liên kết với tế bào Hs700T. Quyết định tối ưu hóa là dựa trên sự liên kết của tế bào caki2. |                           |       |                             |
| ** Vì SG27 không thể hiện các kết quả phân tích nhất quán về độ chuẩn giữa hai toán tử, nên ái lực thấp và nồng độ biệt hóa không được xác định.                  |                           |       |                             |
| *** Nghiên cứu TDH6 không được thực hiện do ái lực quá thấp đối với tế bào đối chứng dương                                                                        |                           |       |                             |

Bằng cách sử dụng các nồng độ tối ưu và biệt hóa thể hiện trong Bảng 7, các đáp ứng IHC của kháng thể B7-H3 trong mô người được xác định. Các kết quả của các phân tích này ở thượng thận, gan, tụy, thận, phổi và ruột kết được thể hiện trong các Bảng 8A-8B và các Bảng 9A-9B (tất cả các kháng thể đều thể hiện các đáp ứng IHC âm tính đối với mô tim).

| <b>Bảng 8A: IHC của mAb B7H3 ở nồng độ tối ưu trong mô người</b> |                    |            |            |
|------------------------------------------------------------------|--------------------|------------|------------|
| <b>mAb</b>                                                       | <b>Thượng thận</b> | <b>Gan</b> | <b>Tụy</b> |

|                        |                     |                                                 |                        |
|------------------------|---------------------|-------------------------------------------------|------------------------|
| BRCA84D<br>0,625 µg/mL | Âm tính             | Tế bào dòng Sinousoid ++<br>Tế bào gan +, 5-10% | Biểu mô + 5%<br>Sợi ++ |
| BRCA68D<br>0,156 µg/mL | Vỏ +++              | Tế bào dòng Sinousoid ++<br>Tế bào gan ++ (m)   | Biểu mô +<br>Sợi ++    |
| BRCA69D<br>0,156 µg/mL | Vỏ +++              | Tế bào gan ++ (m)                               | Biểu mô +<br>Sợi ++    |
| TES7<br>5 µg/mL        | Vỏ +                | Tế bào dòng Sinousoid +                         | Biểu mô + 5%<br>Sợi ++ |
| OVCA22<br>10 µg/mL     | Vỏ +                | Tế bào dòng Sinousoid ++<br>Tế bào gan + (m)    | Biểu mô + 5%<br>Sợi ++ |
| PRCA157<br>0,078 µg/mL | Vỏ ++               | Tế bào dòng Sinousoid ++<br>Tế bào gan + (m)    | Biểu mô + 5%<br>Sợi ++ |
| GB8<br>1,25 µg/mL      | Không được xác định | Tế bào dòng Sinousoid ++<br>Tế bào gan + (m)    | Biểu mô +<br>Sợi ++    |

| <b>Bảng 8B: IHC của mAb B7H3 ở nồng độ tối ưu trong mô người</b> |                           |                      |                 |
|------------------------------------------------------------------|---------------------------|----------------------|-----------------|
| <b>mAb</b>                                                       | <b>Thận</b>               | <b>Phổi</b>          | <b>Ruột kết</b> |
| BRCA84D<br>0,625 µg/mL                                           | Âm tính                   | Biểu mô +<br>(5-10%) | Biểu mô +       |
| BRCA68D<br>0,156 µg/mL                                           | Nguyên bào sợi +,<br>hiếm | Biểu mô +            | Niêm mạc ++     |
| BRCA69D<br>0,156 µg/mL                                           | Nguyên bào sợi +,<br>hiếm | Biểu mô +            | Niêm mạc +      |
| TES7<br>5 µg/mL                                                  | Âm tính                   | Âm tính              | Biểu mô +       |
| OVCA22<br>10 µg/mL                                               | Nguyên bào sợi +          | Âm tính              | Biểu mô +       |
| PRCA157<br>0,078 µg/mL                                           | Âm tính                   | Âm tính              | Niêm mạc +      |
| GB8<br>1,25 µg/mL                                                | Âm tính                   | Biểu mô +            | Niêm mạc +      |

| <b>Bảng 9A: IHC của mAb B7H3 ở nồng độ biệt hóa trong mô người</b> |                    |                         |                         |
|--------------------------------------------------------------------|--------------------|-------------------------|-------------------------|
| <b>mAb</b>                                                         | <b>Thượng thận</b> | <b>Gan</b>              | <b>Tụy</b>              |
| BRCA84D<br>0,078 µg/mL                                             | Âm tính            | Tế bào dòng Sinousoid + | Sợi + (hiếm)            |
| BRCA68D<br>0,0195 µg/mL                                            | Vỏ ++              | Tế bào gan + (m)        | Sợi +                   |
| BRCA69D<br>0,0195 µg/mL                                            | Vỏ ++              | Tế bào gan + (m)        | Sợi +                   |
| TES7<br>1,25 µg/mL                                                 | Nguyên bào sợi +   | Tế bào dòng Sinousoid + | Biểu mô +, 5%<br>Sợi ++ |
| OVCA22<br>2,5 µg/mL                                                | Nguyên bào sợi +   | Tế bào dòng Sinousoid + | Sợi +                   |

|                         |                     |                                             |       |
|-------------------------|---------------------|---------------------------------------------|-------|
| PRCA157<br>0,0195 µg/mL | Không được xác định | Tế bào dòng Sinusoid +<br>Tế bào gan + (m)  | Sợi + |
| GB8<br>0,625 µg/mL      | Không được xác định | Tế bào dòng Sinusoid ++<br>Tế bào gan + (m) | Sợi + |

| <b>Bảng 9B: IHC của mAb B7H3 ở nồng độ biệt hóa trong mô người</b> |             |                   |                 |
|--------------------------------------------------------------------|-------------|-------------------|-----------------|
| <b>mAb</b>                                                         | <b>Thận</b> | <b>Phổi</b>       | <b>Ruột kết</b> |
| BRCA84D<br>0,078 µg/mL                                             | Âm tính     | Âm tính           | Biểu mô +       |
| BRCA68D<br>0,0195 µg/mL                                            | Âm tính     | Tơ huyết + (hiếm) | Niêm mạc +      |
| BRCA69D<br>0,0195 µg/mL                                            | Âm tính     | Âm tính           | Niêm mạc +      |
| TES7<br>1,25 µg/mL                                                 | Âm tính     | Âm tính           | Biểu mô +       |
| OVCA22<br>2,5 µg/mL                                                | Âm tính     | Âm tính           | Biểu mô +       |
| PRCA157<br>0,0195 µg/mL                                            | Âm tính     | Âm tính           | Niêm mạc +      |
| GB8<br>0,625 µg/mL                                                 | Âm tính     | Âm tính           | Niêm mạc +      |

Nghiên cứu IHC được tiến hành bằng cách sử dụng mẫu phẩm ung thư cho thấy rằng kháng thể B7-H3 theo sáng chế có thể được sử dụng để nhận biết và chẩn đoán ung thư trong nhiều nguồn mô (Bảng 10). Trong Bảng 10, các ký tự số chỉ số lượng với dấu cộng (1 = +, 2 = ++, 3 = +++); mỗi ký tự số chỉ một mẫu thử nghiệm khác nhau.

| Bảng 10 |                 |                               |                                                   |                                |                                                   |
|---------|-----------------|-------------------------------|---------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------------------------|
| mAb     | µg/mL           | Ung thư<br>tuyến<br>tiền liệt | Ung thư vú                                        | Ung thư<br>phổi                | Ung thư<br>ruột kết                               |
| BRCA84D | 0,625 µg/mL     | 2, 2, 1                       | 3, 3, 3, 3                                        | 2, 3, 2(mô<br>đệm),<br>1(b.v.) | 2(mô<br>đệm), 3, 3,<br>3(mô<br>đệm)               |
|         | 0,078 µg/mL     | 0, 2, 3, 2                    | 1(mô đệm),<br>1(mô đệm),<br>1(mô đệm), 2,<br>3    | 1, 1, 0, 1                     | 2, 2(mô<br>đệm),<br>1(mô<br>đệm),<br>2(mô<br>đệm) |
| BRCA68D | 0,156 µg/mL     | 2, 3, 3, 3                    | 2, 3, 3, 3, 3                                     | 3, 3, 2, 2                     | 3, 3, 3, 3                                        |
|         | 0,0195<br>µg/mL | 0, 1, 1, 1                    | 0, 0, 2, 2, 1                                     | 0, 1, 1, 0                     | 1, 1, 1, 1                                        |
| BRCA69D | 0,156 µg/mL     | 3, 3, 3                       | 3, 3, 3, 3, 3                                     | 3, 3, 2,<br>2(mô<br>đệm)       | 3, 3, 3, 3                                        |
|         |                 | 0, 1, 2, 1                    | 1, 2, 1, 1                                        | 1, 1, 0, 1                     | 1(b.v.),<br>2(mô<br>đệm), 1, 1                    |
| GB8     | 1,25 µg/mL      | 2, 3, 1                       | 2, 2, 1, 2                                        | 3, 3, 0, 0                     | 2(mô<br>đệm), 2, 2,<br>2                          |
|         | 0,625 µg/mL     | 0, 1, 1                       | 0, 0, 0, 0, 1                                     | 1, 0, 0, 0                     | 1(mô<br>đệm),<br>1(mô<br>đệm), 0, 0               |
| TES7    | 5 µg/mL         | 2, 3, 2, 3                    | 1(mô đệm), 3,<br>3, 3, 2                          | 3, 2, 1(mô<br>đệm),<br>1(b.v.) | 3, 3, 2, 2                                        |
|         | 1,25 µg/mL      | 1, 2, 2, 3                    | 1(mô đệm), 2,<br>3, 3, 2                          | 3, 1, 1(mô<br>đệm),<br>1(b.v.) | 3, 2(mô<br>đệm),<br>2(mô<br>đệm), 2               |
| OVCA22  | 10 µg/mL        | 3, 2, 2, 1                    | 1(mô đệm), 2,<br>2, 3, 3                          | 3, 2, 1(mô<br>đệm), 0          | 1(mô<br>đệm), 1, 1,<br>2(mô<br>đệm)               |
|         | 2,5 µg/mL       | 1, 1, 3, 1                    | 1(mô đệm),<br>1(mô đệm),<br>1(mô đệm), 3,<br>2, 2 | 2, 1, 0, 0                     | 1, 0, 2(mô<br>đệm), 0                             |



|         |                 |            |                                  |                                |                                     |
|---------|-----------------|------------|----------------------------------|--------------------------------|-------------------------------------|
| PRCA157 | 0,078 µg/mL     | 2, 2, 2, 3 | 1, 2, 2, 3, 3                    | 2, 2, 1(mô<br>đệm),<br>1(b.v.) | 3, 3, 2(mô<br>đệm),<br>2(mô<br>đệm) |
|         | 0,0195<br>µg/mL | 0, 1, 2, 1 | 1(mô đệm), 0,<br>2,<br>1(mô đệm) | 0, 1, 0, 0                     | 1, 1, 1(mô<br>đệm),<br>1(mô<br>đệm) |

Với tế bào ung thư tuyến tiền liệt, vú, ruột kết và phổi được điều trị bằng kháng thể B7-H3 BRCA84D, thì có sự nhuộm mẫu khối u ở tế bào khối u và tế bào mô đệm, bao gồm hệ mạch của khối u. Ở một số mẫu khối u, sự nhuộm mô đệm mạnh hơn nhiều so với tế bào khối u. Khi mAb BRCA84D được chuẩn độ đến nồng độ thấp hơn, một số trường hợp thể hiện sự nhuộm giảm trong các tế bào khối u, nhưng vẫn duy trì sự nhuộm mô đệm mạnh. Khi nhuộm bằng BRCA84D ở nồng độ 0,625 µg/mL, tế bào ung thư tuyến tiền liệt biểu hiện IHC bằng 3/3+; tế bào ung thư vú biểu hiện IHC bằng 4/4+; tế bào ung thư ruột kết biểu hiện IHC bằng 4/4+ và tế bào ung thư phổi biểu hiện IHC bằng 4/4+. Khi nhuộm bằng BRCA84D ở nồng độ 0,078 µg/mL, tế bào ung thư tuyến tiền liệt biểu hiện IHC bằng 3/4+; tế bào ung thư vú biểu hiện IHC bằng 5/5+; tế bào ung thư ruột kết biểu hiện IHC bằng 4/4+ và tế bào ung thư phổi biểu hiện IHC bằng 3/4+.

Gan bình thường được điều trị bằng kháng thể B7-H3 BRCA68D và quan sát thấy sự nhuộm ở tế bào gan và tế bào dòng Sinusoid. Tụy bình thường được nhuộm bằng kháng thể B7-H3 BRCA68D biểu hiện sự nhuộm nhiều tiêu điểm trong sợi collagen và biểu mô. Tế bào thượng thận bình thường được điều trị bằng kháng thể B7-H3 BRCA68D, thể hiện sự nhuộm trong vỏ. Khi nhuộm bằng BRCA68D ở nồng độ 0,156 µg/mL, tất cả tế bào ung thư dạ dày, thận và buồng trứng đều biểu hiện IHC bằng 5/5+.

Phân tích nhuộm IHC bổ sung được tiến hành trên mẫu mô ung thư dạ dày, thận và buồng trứng. Các kết quả của phân tích này được thể hiện trong Bảng 12. Trong Bảng 11, ký tự số chỉ số lượng với dấu cộng (1= +, 2= ++, 3 = +++); mỗi ký tự số chỉ một mẫu thử nghiệm khác nhau.

| <b>Bảng 11</b> |              |                               |                         |                                    |
|----------------|--------------|-------------------------------|-------------------------|------------------------------------|
| <b>mAb</b>     | <b>µg/mL</b> | <b>Ung<br/>thư dạ<br/>dày</b> | <b>Ung thư<br/>thận</b> | <b>Ung thư<br/>buồng<br/>trứng</b> |

|         |                 |           |             |           |
|---------|-----------------|-----------|-------------|-----------|
| BRCA84D | 0,625<br>μg/mL  | 2,1,2,2,2 | 1,2,1,1,1   | 0,3,1,2,2 |
|         | 0,078<br>μg/mL  | 1,0,0,1,0 | 0,1,0,1,0,1 | 0,2,0,1,1 |
| BRCA68D | 0,156<br>μg/mL  | 3,2,3,3,3 | 3,3,2,3,3,3 | 2,3,3,2,2 |
|         | 0,0195<br>μg/mL | 2,1,2,1,1 | 2,2,2,2,2,2 | 1,2,2,1,1 |
| OVCA22  | 10 μg/mL        | 3,1,3,1,1 | 3,1,2,3,0,2 | 2,3,2,1,1 |
|         | 2,5 μg/mL       | 2,0,2,1,0 | 2,1,1,2,0,1 | 1,2,1,0,1 |
| TES7    | 5 μg/mL         | 2,1,3,2,1 | 2,3,1,2,2,1 | 1,3,1,2,2 |
|         | 1,25 μg/mL      | 2,0,2,1,1 | 2,2,1,1,1,1 | 1,3,1,2,2 |

Tóm lại, tất cả các mAb được thử nghiệm thể hiện cường độ nhuộm khác nhau trong gan, tụy, ruột kết và phổi bình thường. Fig.1A thể hiện các kết quả của nghiên cứu IHC được tiến hành bằng cách sử dụng các mẫu phẩm mô tụy, gan, phổi và ruột kết bình thường với BRCA84D ở nồng độ 0,625 μg/mL và 0,078 μg/mL. Việc nhuộm gan bị hạn chế tương đối ở tế bào dòng sinusoid (nguyên bào sợi và tế bào kupffer) bằng BRCA84D và TES7. OVCA22 thể hiện sự nhuộm màng tế bào gan bên cạnh sự nhuộm tế bào dòng sinusoid ở nồng độ tối ưu. Tuy nhiên, sự nhuộm ở tế bào gan biến mất ở nồng độ biệt hóa. Tất cả các mAb còn lại thể hiện sự nhuộm ở tế bào gan bao gồm sự nhuộm màng hoặc tế bào chất ở cả nồng độ tối ưu và nồng độ biệt hóa. Việc nhuộm tụy được quan sát thấy chủ yếu ở sợi collagen và một phần trăm nhỏ ở biểu mô (tế bào hạt hoặc/và tế bào ống góp). Sự nhuộm ở biểu mô giảm đi hoặc biến mất ở nồng độ biệt hóa. Sự nhuộm ruột kết bị hạn chế tương đối ở màng đỉnh của biểu mô mỏng mắt và nguyên bào sợi trong niêm mạc. Không quan sát thấy có liên kết trong hạch lympho của ruột kết. Phổi thể hiện sự nhuộm rất yếu và không đều ở biểu mô với BRCA84D, BRCA68D, BRCA69D và GB8. Tuy nhiên, sự nhuộm biến mất ở nồng độ biệt hóa. Không quan sát thấy sự nhuộm ở phổi với TES7, OVCA22 và PRCA157 ở cả hai nồng độ. Sự nhuộm vỏ thượng thận được quan sát thấy với hầu hết tất cả các mAb ở nồng độ tối ưu, ngoại trừ BRCA84D. Sự nhuộm trong thượng thận giảm đi rõ rệt với TES7 và OVCA22 ở nồng độ biệt hóa. Tim và thận không thể hiện sự nhuộm rõ ràng với tất cả các mAb (Fig.1B). Về các tính chất này, BRCA84D được coi là tốt nhất trong các mAb, sau đó đến thứ tự là (2) TES7, (3) OVCA22, (4) nhóm BRCA68D, BRCA69D và PRCA157 và cuối cùng là (5) GB8.

Tất cả các mAb được bao gồm trong nghiên cứu đều thể hiện sự nhuộm dương trong 4 loại ung thư ở nồng độ tối ưu. Ở nồng độ biệt hóa, BRCA84D vẫn duy trì được sự nhuộm tốt trong ung thư tuyến tiền liệt, ung thư vú và ung thư ruột kết. TES7 duy trì được sự nhuộm tốt trong 4 loại ung thư nghiên cứu. Các mAb còn lại thể hiện các cường độ nhuộm khác nhau trong các loại khối u khác nhau. Việc nhuộm mẫu khối u được quan sát ở tế bào khối u và tế bào mô đệm, bao gồm hệ mạch. Một số mẫu khối u thể hiện sự nhuộm dương chỉ trong hệ mạch, tức là BRCA84D, BRCA69D, TES7 và PRCA157. Một số khối u thể hiện sự nhuộm mô đệm mạnh hơn so với sự nhuộm tế bào khối u. Khi các mAb được chuẩn độ đến nồng độ thấp hơn trên các mẫu này, thì một số trường hợp thể hiện sự nhuộm giảm hoặc không nhuộm trong tế bào khối u, nhưng vẫn duy trì được sự nhuộm mô đệm mạnh. Nhìn chung, đối với sự biểu hiện trong các mô bình thường của người và sự biểu hiện biệt hóa trong các mô bình thường so với mô khối u, thứ tự mAb từ tính năng IHC tốt nhất đến tính năng kém nhất là như sau đây: (1) BRCA84D, (2) TES7, (3) OVCA22, (4) nhóm BRCA68D, BRCA69D và PRCA157 và cuối cùng là (5) GB8. Bảng 12 và Fig.2 thể hiện các kết quả đối với kháng thể BRCA84D.

| <b>Bảng 12</b>  |                        |                        |
|-----------------|------------------------|------------------------|
| Loại mô ung thư | BRCA84D<br>0,625 µg/mL | BRCA84D<br>0,078 µg/mL |
| Tuyến tiền liệt | 3/3+                   | 3/4+                   |
| Vú              | 4/4+                   | 5/5+                   |
| Ruột kết        | 4/4+                   | 4/4+                   |
| Phổi            | 4/4+                   | 3/4+                   |

#### Ví dụ 2

Tính phản ứng chéo của B7-H3 của khí đuôi dài

Trình tự của B7-H3 của khí đuôi dài có độ tương đồng khoảng 90% với trình tự này của người, đề xuất rằng khí đuôi dài là mô hình tốt để tương tác với B7-H3 của người. Nghiên cứu được tiến hành để đánh giá tính phản ứng chéo của các ứng viên của B7H3 là BRCA84D, BRCA68D, BRCA69D, TES7, OVCA22 và PRCA157 với tuyến thượng thận, gan, thận, tụy và phổi cũng như trường hợp nhau thai đầy kỳ của khí đuôi dài, để so sánh tính phản ứng chéo bất kỳ với cường độ nhuộm và dấu nhuộm quan sát thấy ở mô người.

Nồng độ nhuộm của mỗi Mab thử nghiệm là nồng độ tối ưu được xác định ở tế bào đối chứng dương Caki-2 và Hs700T (xem Bảng 8). Kháng thể kháng B7-H3 của người ở đề bán trên thị trường (được phản ứng chéo với khi đuôi dài) được chọn làm kháng thể đối chứng dương để nhuộm mô nhau thai của khi đuôi dài. Đối chứng isotyp tương ứng được sử dụng trong mỗi lần thực hiện thử nghiệm. Các kết quả nghiên cứu được thể hiện trong Bảng 13.

| <b>Bảng 13</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                           |                             |                                                      |                             |                        |                   |                                                    |
|--------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------------------------------------|-----------------------------|------------------------|-------------------|----------------------------------------------------|
| <b>mAb</b>                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                               | <b>Tuyến thượng thận(2)</b> | <b>Gan(2)</b>                                        | <b>Tụy(2)</b>               | <b>Thận(2)</b>         | <b>Phổi(2)</b>    | <b>Nhau thai(1)</b>                                |
| BRCA84D<br>0,625<br>µg/mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Âm tính                     | Âm tính                                              | Âm tính                     | Âm tính                | 1/2<br>Biểu mô 1+ | Tế bào màng rưng 2+<br>Tế bào trung mô âm tính     |
| BRCA68D<br>0,156<br>µg/mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Vỏ 3+                       | 2/2<br>Tế bào gan 1+ (m)<br>Tế bào dòng Sinousoid 1+ | 1/2<br>Sợi 2+<br>Biểu mô 1+ | Nguyên bào sợi 1+      | Âm tính           | Tế bào màng rưng, nhung mao, tế bào trung mô 3+    |
| BRCA69D<br>0,156<br>µg/mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Vỏ 2+                       | 1/2<br>Tế bào gan 1+ (m)                             | 1/2<br>Biểu mô 1+           | Nguyên bào sợi 1+ hiếm | Âm tính           | Tế bào màng rưng 2+, nhung mao, tế bào trung mô 2+ |
| TES7<br>5 µg/mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                          | Âm tính                     | Âm tính                                              | Âm tính                     | Âm tính                | Âm tính           | Âm tính                                            |
| OVCA22<br>10 µg/mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                       | Âm tính                     | Âm tính                                              | Âm tính                     | Âm tính                | âm tính           | Âm tính                                            |
| PRCA157<br>0,078<br>µg/mL                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                                | Vỏ 1+                       | 1/2<br>Tế bào gan 1+ (m)                             | Âm tính                     | Âm tính                | Âm tính           | Tế bào màng rưng 2+, nhung mao, tế bào trung mô 1+ |
| Lưu ý: BRCA84D thể hiện sự nhuộm âm trong gan và tụy ở nồng độ lên tới 5µg/mL. Mặc dù OVCA22 không liên kết với mô khi đuôi dài trong IHC, quan sát thấy có liên kết vừa phải với B7H3 tái tổ hợp của khi đuôi dài trên tế bào CHO. Điểm số IHC ở các mô bình thường là số âm, hệ bậc 1+, 2+ và 3+ 4; m=màng; 2/2= 2 trong số 2 trường hợp, 1/2= 1 trong số 2 trường hợp |                             |                                                      |                             |                        |                   |                                                    |

Nghiên cứu về sự nhuộm IHC bằng BRCA84D (0,625 µg/mL) trong nhau thai khi đuôi dài biểu hiện sự nhuộm trong tế bào màng rưng, nhưng không trong nhung

mao. Không quan sát thấy sự nhuộm trong gan và tụy của khí đuôi dài, tuy nhiên, lại quan sát thấy sự nhuộm tế bào dòng Sinusoid ở gan người và quan sát thấy sự nhuộm sợi và biểu mô đã định vị ở mô tụy người.

Nghiên cứu về sự nhuộm IHC bằng BRCA68D (0,156 µg/mL) trong nhau thai khí đuôi dài biểu hiện sự nhuộm trong tế bào màng rụng, tế bào trung mô (nội mô và nguyên bào sợi) và nhung mao. Sự nhuộm có trong màng tế bào gan và tế bào chất của nguyên bào sợi gan, cũng như trong sợi tụy và trong tế bào chất của biểu mô tụy. Do đó, mô gan và tụy của người và khí đuôi dài thể hiện các dấu nhuộm tương tự với BRCA68D.

Tóm lại, BRCA84D, BRCA68D, BRCA69D và PRCA157 đều thể hiện tính phản ứng chéo ở mô của khí đuôi dài. BRCA84D không thể hiện sự nhuộm trong gan và tụy của khí; sự nhuộm này được quan sát trong các mô gan người và tụy người. BRCA68D và BRCA69D thể hiện cường độ nhuộm và dấu nhuộm tương tự trong các mô ở khí. Mặc dù BRCA68D, BRCA69D và PRCA157 thể hiện dấu nhuộm tương đương với mô người, cường độ nhuộm này không giống hết với mô người trong các điều kiện tối ưu. TES7 và OVCA22 không thể hiện sự nhuộm bất kỳ trong các mô ở khí trong các điều kiện tối ưu.

Tóm tắt về các kết quả so sánh nhuộm IHC ở mô khí đuôi dài và mô người được nêu trong Bảng 14.

| <b>Bảng 14</b>                            |                    |                                                              |                                 |             |                         |                                                                   |
|-------------------------------------------|--------------------|--------------------------------------------------------------|---------------------------------|-------------|-------------------------|-------------------------------------------------------------------|
| <b>mAb</b>                                | <b>Thượng thận</b> | <b>Gan</b>                                                   | <b>Tụy</b>                      | <b>Thận</b> | <b>Phổi</b>             | <b>Nhau thai</b>                                                  |
| BRCA84D<br>0,625<br>µg/mL<br>Khí đuôi dài | Âm tính            | Âm tính                                                      | Âm tính                         | Âm tính     | 1/2<br>Biểu mô<br>1+    | Tế bào<br>màng rụng<br>2+<br>Tế bào<br>trung mô<br>âm tính        |
| BRCA84D<br>0,625<br>µg/mL<br>Người        | Âm tính            | 2/2<br>Tế bào<br>dòng<br>Sinusoid<br>2+, Tế<br>bào gan<br>1+ | Biểu mô<br>1+,<br>5%,<br>Sợi 2+ | Âm tính     | Biểu mô<br>1+,<br>5-10% | Tế bào<br>màng rụng<br>1+, nhung<br>mao, tế<br>bào trung<br>mô 1+ |

|                                              |       |                                                                     |                                |                                 |               |                                                                   |
|----------------------------------------------|-------|---------------------------------------------------------------------|--------------------------------|---------------------------------|---------------|-------------------------------------------------------------------|
|                                              |       | 5-10%                                                               |                                |                                 |               |                                                                   |
| BRCA68D<br>0,156<br>µg/mL<br>Khí đuôi<br>dài | Vỏ 3+ | 2/2<br>Tế bào<br>gan 1+<br>(m)<br>Tế bào<br>dòng<br>Sinousoid<br>1+ | 1/2<br>Sợi 2+<br>Biểu mô<br>1+ | Nguyên<br>bào sợi<br>1+         | Âm tính       | Tế bào<br>màng<br>rụng,<br>nhưng<br>mao, tế<br>bào trung<br>mô 3+ |
| BRCA68D<br>0,156<br>µg/mL<br>Người           | Vỏ 3+ | Tế bào<br>dòng<br>Sinousoid<br>2+, Tế<br>bào gan<br>2+ (m)          | Biểu mô<br>1+<br>Sợi 2+        | Nguyên<br>bào sợi<br>1+<br>hiếm | Biểu mô<br>1+ | Tế bào<br>màng rụng<br>3+, nhưng<br>mao, tế<br>bào trung<br>mô 3+ |
| BRCA69D<br>0,156<br>µg/mL<br>Khí đuôi<br>dài | Vỏ 2+ | 1/2<br>Tế bào<br>gan 1+<br>(m)                                      | 1/2<br>Biểu mô<br>1+           | Nguyên<br>bào sợi<br>1+<br>hiếm | Âm tính       | Tế bào<br>màng rụng<br>2+, nhưng<br>mao, tế<br>bào trung<br>mô 2+ |
| BRCA69D<br>0,156<br>µg/mL<br>Người           | Vỏ 3+ | Tế bào<br>gan 2+<br>(m)                                             | Biểu mô<br>1+<br>Sợi 2+        | Nguyên<br>bào sợi<br>1+<br>hiếm | Biểu mô<br>1+ | Tế bào<br>màng rụng<br>3+, nhưng<br>mao, tế<br>bào trung<br>mô 3+ |
| PRCA157<br>0,078<br>µg/mL<br>Khí đuôi<br>dài | Vỏ 1+ | 1/2<br>Tế bào<br>gan 1+<br>(m)                                      | Âm tính                        | Âm tính                         | Âm tính       | Tế bào<br>màng rụng<br>2+, nhưng<br>mao, tế<br>bào trung<br>mô 1+ |
| PRCA157<br>0,078<br>µg/mL<br>Người           | Vỏ 2+ | Tế bào<br>dòng<br>Sinousoid<br>2+, Tế<br>bào gan<br>1+ (m)          | Biểu mô<br>1+ 5%<br>Sợi 2+     | Âm tính                         | Âm tính       | Không<br>được xác<br>định                                         |

## Ví dụ 3

mAB B7-H3 liên kết với nhiều dòng tế bào ung thư ATCC

Kháng thể theo sáng chế được phát hiện là có khả năng liên kết với nhiều dòng tế bào ung thư có trong các bộ sưu tập của Bộ sưu tập Giống chuẩn Hoa Kỳ. Bảng 15

và Bảng 16 tóm tắt các kết quả liên kết.

| <b>Bảng 15</b>                                     |                  |                |                |                |                |
|----------------------------------------------------|------------------|----------------|----------------|----------------|----------------|
|                                                    | <b>Kháng thể</b> |                |                |                |                |
| <b>Dòng tế bào</b>                                 | <b>BLA08</b>     | <b>BRCA68D</b> | <b>BRCA69D</b> | <b>BRCA84D</b> | <b>PRCA157</b> |
| <b>Dòng tế bào bình thường</b>                     |                  |                |                |                |                |
| HMEC                                               | ++/+++           | +++            | +++            | ++             |                |
| HUVEC                                              | ND               | ++             | +/++           | +/-            | +/++           |
| <b>Dòng tế bào ung thư vú ở người</b>              |                  |                |                |                |                |
| BT474                                              | +++              | ++             | ++/+++         | +/++           | ++/+++         |
| MCF7                                               | +++              | ++             | ++/+++         | +              | ++             |
| MDA175                                             | ND               |                |                |                |                |
| MDA361                                             | ND               | ++             |                | +/+/-          | ++             |
| SKBR3                                              | +++              |                | ++             |                |                |
| <b>Dòng tế bào ung thư phổi ở người</b>            |                  |                |                |                |                |
| A549                                               | +++              | +/+/-          | +/-            |                | +/-            |
| Calu3                                              | +++              | +/++           | +              |                | +/++           |
| SKMES1                                             | +++              | ++             | ++/+++         | +/++           | ++             |
| <b>Dòng tế bào ung thư buồng trứng ở người</b>     |                  |                |                |                |                |
| ES-2                                               | +++              | +/-            |                |                |                |
| SKOV3                                              | +++              | ++             | +/++           | +/+/-          | ++             |
| <b>Dòng tế bào ung thư tụy ở người</b>             |                  |                |                |                |                |
| Panc-1                                             | ++/+++           | +/++           | +/++           | +/+/-          | +/++           |
| AsPC-1                                             | +++              |                |                |                |                |
| HPAFII                                             | +++              |                |                |                |                |
| Hs700T                                             | +++              | ++/+++         |                | +++            | +++            |
| <b>Dòng tế bào ung thư ruột kết ở người</b>        |                  |                |                |                |                |
| Colo205                                            | ND               |                |                |                |                |
| HT-29                                              | +++              | +              | +              |                | +              |
| SW480                                              | +++              | +/-            |                | +/-            |                |
| SW948                                              | ND               | +              | +              |                |                |
| <b>Dòng tế bào ung thư thận ở người</b>            |                  |                |                |                |                |
| 293                                                | +++              | ++             | ++             | +              | ++/+++         |
| 786-0                                              | +++              | ++             | ++             | +              | ++/+++         |
| A498                                               | +++              | ++             | ++             | ++             | ++/+++         |
| Caki2                                              | +++              | +++            | +++            | ++             | ++/+++         |
| <b>Dòng tế bào không phải của người</b>            |                  |                |                |                |                |
| Cos7                                               | +++              | +              | +/++           | +/-            | +/++           |
| RL65                                               | -                |                |                |                |                |
| SVT2                                               | ND               |                |                |                |                |
| <b>Dòng tế bào ung thư tuyến tiền liệt ở người</b> |                  |                |                |                |                |
| 22Rv1                                              | +++              |                |                |                |                |
| DU145                                              | +++              | +              | +              | +              | +/+/-          |
| LNCaP                                              | +++              | ++             | ++             | +/++           | ++/+++         |

|                                           |     |       |       |     |     |
|-------------------------------------------|-----|-------|-------|-----|-----|
| PC3                                       | +++ | +/+/- | +/-   | +/- | +/- |
| TDH                                       | ND  | +/+/- | +/+/- |     | +   |
| <b>Dòng tế bào ung thư dạ dày ở người</b> |     |       |       |     |     |
| HS746T                                    | ND  | +++   | +++   | +   | ++  |
| N87                                       | ND  | +++   | +++   | +/- | +++ |

| <b>Bảng 16</b>                                 |              |               |            |             |             |
|------------------------------------------------|--------------|---------------|------------|-------------|-------------|
| <b>Kháng thể</b>                               |              |               |            |             |             |
| <b>Dòng tế bào</b>                             | <b>TDH06</b> | <b>OVCA22</b> | <b>GB8</b> | <b>SG27</b> | <b>TES7</b> |
| <b>Dòng tế bào bình thường</b>                 |              |               |            |             |             |
| HMEC                                           |              |               |            |             |             |
| HUVEC                                          | +/+/-        |               | +/-        | +/-         |             |
| <b>Dòng tế bào ung thư vú ở người</b>          |              |               |            |             |             |
| BT474                                          | +++          | +             | ++         | +++         | +++         |
| MCF7                                           | +            | +             | ++         | +/+/-       | +           |
| MDA175                                         |              | ++            |            |             |             |
| MDA361                                         | +/+/-        |               |            |             | +           |
| SKBR3                                          |              | ++            |            |             |             |
| <b>Dòng tế bào ung thư phổi ở người</b>        |              |               |            |             |             |
| A549                                           |              |               |            |             |             |
| Calu3                                          |              |               | +          |             |             |
| SKMES1                                         | +++          | +/-           | +++        | +           | +           |
| <b>Dòng tế bào ung thư buồng trứng ở người</b> |              |               |            |             |             |
| ES-2                                           |              |               |            |             |             |
| SKOV3                                          | +            |               |            |             | +/+/-       |
| <b>Dòng tế bào ung thư tụy ở người</b>         |              |               |            |             |             |
| Panc-1                                         | +/+/-        |               | +          | +/-         | +/+/-       |
| AsPC-1                                         |              |               |            |             |             |
| HPAFII                                         |              | +             |            |             |             |
| Hs700T                                         | +            | +++           | +++        | +           | +++         |
| <b>Dòng tế bào ung thư ruột kết ở người</b>    |              |               |            |             |             |
| Colo205                                        |              | +             |            |             |             |
| HT-29                                          | +            | +/+/-         |            |             | +/+/-       |
| SW480                                          | +/-          | +++           |            |             |             |
| SW948                                          | +/-          | +             |            |             |             |
| <b>Dòng tế bào ung thư thận ở người</b>        |              |               |            |             |             |
| 293                                            | +/+/-        |               | +          | +/+/-       | +           |
| 786-0                                          | +            |               | +          | +/-         | +           |
| A498                                           | +            |               | +++        |             | +++         |
| Caki2                                          | ++           | +             | +++        | +++         | ++          |
| <b>Dòng tế bào không phải của người</b>        |              |               |            |             |             |
| Cos7                                           | +            |               | +/+/- *    | +/-         |             |
| RL65                                           |              |               |            |             |             |



|                                           |       |       |       |       |     |
|-------------------------------------------|-------|-------|-------|-------|-----|
| SVT2                                      |       |       |       |       |     |
| <b>Ung thư tuyến tiền liệt ở người</b>    |       |       |       |       |     |
| 22Rv1                                     |       | +     |       |       |     |
| DU145                                     | +/-   | +     |       |       |     |
| LNCaP                                     | +/+/- | +     | +     | +/+/- | +   |
| PC3                                       |       |       |       |       |     |
| TDH                                       |       | +++   | +/-   |       | +/- |
| <b>Dòng tế bào ung thư dạ dày ở người</b> |       |       |       |       |     |
| HS746T                                    | +     |       | +/+/- | +/-   | +/- |
| N87                                       |       | +/+/- | +/-   |       |     |

#### Ví dụ 4

#### Tiêu diệt đôi hướng mAB B7-H3

Kháng thể theo sáng chế liên kết với B7-H3 có mặt trên bề mặt của tế bào ung thư. Bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường, các kháng thể này có thể được đánh dấu bằng fluorescein, như được mô tả ở trên. Khi các phân tử được đánh dấu này được ủ với sự có mặt của phân tử UDART™ có miền liên kết epitop liên kết với thụ thể tế bào T và miền liên kết epitop liên kết với fluorescein (“TCR-UDART™”), chúng có thể liên kết với phân tử DART™ và vì thế định vị chúng vào bề mặt của tế bào biểu hiện B7-H3 và gây ra sự tiêu diệt đôi hướng.

#### A. Đôi hướng sự tiêu diệt tế bào caxinom thận A498

Để chứng minh sự tiêu diệt đôi hướng này, kháng thể B7-H3 đánh dấu fluorescein được ủ với phân tử TCR-UDART™ này và khả năng điều tiết quá trình gây độc tế bào đối với tế bào caxinom thận A498 của phân tử được đánh giá (Bảng 17). Dựa trên cơ sở các kết quả có được, các ứng viên hàng đầu được kết luận là: RECA13, BRCA68D, BRCA69D và TDH6.

| <b>Bảng 17: Tiêu diệt đôi hướng đối với tế bào caxinom thận A498</b> |                        |                      |             |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------|-------------|
| <b>mAb</b>                                                           | <b>Không có UDART™</b> | <b>Có TCR-UDART™</b> | <b>FACS</b> |
|                                                                      | <b>Trung bình</b>      | <b>Trung bình</b>    | <b>MFI</b>  |
| <b>BCCA66</b>                                                        | -1,04                  | 46,39                | 43,30       |
| <b>BLA8</b>                                                          | 1,35                   | 49,19                | 50          |
| <b>BRCA165</b>                                                       | 0                      | 5,11                 | 5,46        |
| <b>BRCA52</b>                                                        | 0                      | 55,53                | 41,7        |
| <b>BRCA68D</b>                                                       | 0                      | 36,89                | 83,7        |
| <b>BRCA69D</b>                                                       | 0                      | 54,71                | 84,1        |

| <b>Bảng 17: Tiêu diệt đổi hướng đối với tế bào caxinom thận A498</b> |                        |                      |             |
|----------------------------------------------------------------------|------------------------|----------------------|-------------|
| <b>mAb</b>                                                           | <b>Không có UDART™</b> | <b>Có TCR-UDART™</b> | <b>FACS</b> |
|                                                                      | <b>Trung bình</b>      | <b>Trung bình</b>    | <b>MFI</b>  |
| <b>BRCA84D</b>                                                       | 0                      | 72,40                | 30,6        |
| <b>GB8</b>                                                           | 4,00                   | 42,00                | 17,9        |
| <b>KID1</b>                                                          | 0,38                   | 52,08                | 18,5        |
| <b>KID13</b>                                                         | 26,39                  | 58,20                |             |
| <b>KID35</b>                                                         | -1,68                  | 7,62                 |             |
| <b>LUCA1</b>                                                         | 9,85                   | 52,73                | 52,9        |
| <b>OVCA21</b>                                                        | -0,85                  | 47,59                | 6,04        |
| <b>OVCA22</b>                                                        | 0,36                   | 38,66                | 53,9        |
| <b>OVCA25</b>                                                        | -2,86                  | 16,70                |             |
| <b>PA40</b>                                                          | -0,46                  | 40,54                |             |
| <b>PRCA123</b>                                                       | 0                      | 56                   | 130         |
| <b>PRCA135</b>                                                       | 0                      | 55                   | 127         |
| <b>PRCA157</b>                                                       | 0                      | 39,14                | 58,8        |
| <b>RECA13</b>                                                        | 0                      | 38,62                | 39,8        |
| <b>RECA22</b>                                                        | -0,24                  | 51,74                | 99,90       |
| <b>RECA9</b>                                                         | 0                      | 62                   | 50,1        |
| <b>SAL3</b>                                                          | 4,94                   | 52,23                | 60,5        |
| <b>SG24</b>                                                          | -2,25                  | 42,00                |             |
| <b>SG27</b>                                                          | -3,98                  | 0,21                 |             |
| <b>SKIN2</b>                                                         | 3,11                   | 56,44                | 45,8        |
| <b>STO5</b>                                                          | 2,91                   | 37,84                | 36,7        |
| <b>TDH36</b>                                                         | -1,03                  | 53,52                | 155,00      |
| <b>TDH37</b>                                                         | 0,05                   | 65,21                | 47,50       |
| <b>TDH4</b>                                                          | 5,09                   | 50,63                | 45,9        |
| <b>TDH40</b>                                                         | -0,65                  | 44,55                |             |
| <b>TDH5</b>                                                          | 2,92                   | 49,60                | 28,8        |
| <b>TDH6</b>                                                          | 0                      | 70,10                | 19,5        |
| <b>TES7</b>                                                          | 6,23                   | 52,89                | 17,5        |

Tế bào caxinom thận A498 được ủ với các nồng độ khác nhau của kháng thể đơn dòng có phản ứng kháng B7-H3 để xác định sự tiêu diệt đổi hướng phụ thuộc vào liều được điều tiết bởi kháng thể. Kết quả của các thử nghiệm (Fig.3A-Fig.3B) cho thấy rằng sự tiêu diệt đổi hướng là phụ thuộc vào liều.

#### B. Đổi hướng sự tiêu diệt tế bào ung thư phổi A549

Để chứng minh thêm về sự tiêu diệt đổi hướng này, kháng thể B7-H3 đánh dấu fluorescein được ủ với phân tử TCR-UDART™ mô tả ở trên hoặc với phân tử

UDART™ có miền liên kết epitop liên kết với CD16 và miền liên kết epitop liên kết với fluorescein (“CD16-UDART™”), và khả năng điều tiết quá trình gây độc tế bào đối với tế bào ung thư phổi A549 của các phân tử này được đánh giá (Bảng 18). Kết quả của các thử nghiệm (Fig.3C-Fig.3D) thể hiện rằng sự tiêu diệt đối hướng phụ thuộc vào liều. Dựa trên cơ sở các kết quả có được, các ứng viên hàng đầu được kết luận là: BLA8, BRCA68D, BRCA69D và BRCA84D.

| <b>Bảng 18: Tiêu diệt đối hướng đối với tế bào ung thư phổi A549</b> |                       |                      |                       |             |
|----------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------|
| <b>mAb</b>                                                           | <b>Không có DART™</b> | <b>Có TCR-UDART™</b> | <b>Có CD16-UDART™</b> | <b>FACS</b> |
|                                                                      | <b>Trung bình</b>     | <b>Trung bình</b>    | <b>Trung bình</b>     | <b>MFI</b>  |
| <b>BCCA66</b>                                                        | 1,89                  | 25,17                | 8,22                  | 36,1        |
| <b>BLA8</b>                                                          | -7,70                 | 10,97                | 3,68                  | 34,7        |
| <b>BRCA52</b>                                                        | 0                     | 27,63                |                       | 37          |
| <b>BRCA68D</b>                                                       | -4,42                 | 13,45                | 15,95                 | 58,3        |
| <b>BRCA69D</b>                                                       | 0                     | 24,25                |                       | 60,5        |
| <b>BRCA84D</b>                                                       | 0                     | 15,33                |                       | 25          |
| <b>GB8</b>                                                           | -8,68                 | 2,44                 | -4,65                 | 17          |
| <b>KID1</b>                                                          | 0                     | 22,93                |                       | 41          |
| <b>LUCA1</b>                                                         | 0                     | 14,65                |                       | 53          |
| <b>OVCA21</b>                                                        | -2,43                 | 18,90                | 7,22                  | 31,5        |
| <b>OVCA22</b>                                                        | 0                     | 32,90                |                       | 61          |
| <b>PRCA123</b>                                                       | 7,68                  | 29,88                | 17,31                 | 79,4        |
| <b>PRCA135</b>                                                       | -6,58                 | 22,72                | 8,14                  | 75,6        |
| <b>PRCA157</b>                                                       | 0,02                  | 18,63                | 18,24                 | 44,3        |
| <b>PSMA</b>                                                          | -0,70                 | 5,58                 | 9,94                  |             |
| <b>RECA13</b>                                                        | 0,86                  | 17,39                | 11,90                 | 34,4        |
| <b>RECA22</b>                                                        | 3,71                  | 20,49                | 19,35                 | 74,3        |
| <b>RECA9</b>                                                         | 7,01                  | 26,89                | 31,80                 | 44,3        |
| <b>SAL3</b>                                                          | 0                     | 31,80                |                       | 67,4        |
| <b>SKIN2</b>                                                         | -0,08                 | 8,65                 | 9,33                  | 41,9        |
| <b>STO5</b>                                                          | -10,36                | 9,28                 | 1,71                  | 54,7        |
| <b>TDH36</b>                                                         | 6,79                  | 24,12                | 24,08                 | 107         |
| <b>TDH37</b>                                                         | 6,93                  | 22,57                | 23,37                 | 42,3        |
| <b>TDH4</b>                                                          | -6,26                 | 10,07                | 2,21                  | 32,4        |
| <b>TDH40</b>                                                         | 4,87                  | 22,01                | 24,90                 | 53,3        |
| <b>TDH5</b>                                                          | -5,08                 | 9,35                 | -2,85                 | 27,1        |
| <b>TDH6</b>                                                          | 0                     | 19,09                |                       | 21,3        |
| <b>TES7</b>                                                          | 0                     | 19,35                |                       | 15,7        |

#### C. Đối hướng sự tiêu diệt tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCap

Để chứng minh tiếp sự tiêu diệt đối hướng này, kháng thể B7-H3 được đánh dấu

fluorescein được ủ với phân tử TCR-UDART™ nêu trên hoặc với phân tử UDART™ có miền liên kết epitop liên kết với CD16 và miền liên kết epitop liên kết với fluorescein (“CD16-UDART™”), và khả năng điều tiết quá trình gây độc tế bào của tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNcap của phân tử được đánh giá (Bảng 19). Dựa trên cơ sở các kết quả có được, các ứng viên hàng đầu được kết luận là: BRCA68D, BRCA69D, BRCA84D và PRCA157.

| <b>Bảng 19: Tiêu diệt đổi hướng đối với tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNcap</b> |                       |                      |                       |             |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------|
| <b>mAb</b>                                                                       | <b>Không có DART™</b> | <b>Có TCR-UDART™</b> | <b>Có CD16-UDART™</b> | <b>FACS</b> |
|                                                                                  | <b>Trung bình</b>     | <b>Trung bình</b>    | <b>Trung bình</b>     | <b>MFI</b>  |
| <b>BCCA4</b>                                                                     | -2,96                 | 13,29                | 2,47                  | 5,1         |
| <b>BCCA66</b>                                                                    | -2,13                 | 13,42                | 16,40                 | 41          |
| <b>BLA8</b>                                                                      | 4,32                  | 14,97                | 24,00                 | 48,4        |
| <b>BRCA165</b>                                                                   | 3,59                  | 57,26                | 12,02                 | 7,6         |
| <b>BRCA183D</b>                                                                  | -4,65                 | 43,09                | 35,30                 | 7,6         |
| <b>BRCA52</b>                                                                    | 32,34                 | 71,23                | 48,28                 | 42,5        |
| <b>BRCA68D</b>                                                                   | -1,40                 | 23,00                | 21,91                 | 86,9        |
| <b>BRCA69D</b>                                                                   | 40,08                 | 78,02                | 60,55                 | 92,4        |
| <b>BRCA84D</b>                                                                   | 20,11                 | 78,70                | 41,27                 | 16,4        |
| <b>GB8</b>                                                                       | -6,25                 | 14,04                | 10,76                 | 22          |
| <b>KID1</b>                                                                      | 54,65                 | 91,87                | 67,86                 | 44,8        |
| <b>KID13</b>                                                                     | 15,86                 | 69,21                | 47,85                 |             |
| <b>KID133</b>                                                                    | 27,51                 | 45,65                | 47,12                 | 120         |
| <b>KID24</b>                                                                     | -4,26                 | 34,13                | 41,17                 | 14,5        |
| <b>KID35</b>                                                                     | 14,17                 | 64,01                | 33,05                 |             |
| <b>KID47</b>                                                                     | 11,34                 | 39,49                | 15,02                 | 10,8        |
| <b>KID8</b>                                                                      | 16,98                 | 58,80                | 34,77                 | 5,5         |
| <b>LUCA1</b>                                                                     | 47,40                 | 89,31                | 67,15                 | 73          |
| <b>LUCA17</b>                                                                    | 23,18                 | 26,90                | 35,87                 | 11,1        |
| <b>LUCAT1</b>                                                                    | 8,25                  | 22,36                | 21,49                 | 6,9         |
| <b>LUCAT7</b>                                                                    | 26,50                 | 38,29                | 44,77                 | 8,7         |
| <b>MCL12</b>                                                                     | 26,62                 | 35,59                | 46,38                 | 17,6        |
| <b>MEL2</b>                                                                      | 6,57                  | 29,90                | 31,40                 | 19          |
| <b>OVCA21</b>                                                                    | 12,07                 | 26,81                | 31,30                 | 41          |
| <b>OVCA22</b>                                                                    | 45,09                 | 96,50                | 77,30                 | 113         |
| <b>OVCA25</b>                                                                    | 16,14                 | 63,26                | 32,39                 |             |
| <b>PA22</b>                                                                      | 1,73                  | 57,70                | 9,89                  | 8,9         |
| <b>PA33</b>                                                                      | 8,99                  | 34,49                | 48,14                 | 9,4         |
| <b>PA40</b>                                                                      | 38,42                 | 73,07                | 63,65                 |             |
| <b>PRCA123</b>                                                                   | 9,96                  | 14,39                | 18,38                 | 125         |
| <b>PRCA135</b>                                                                   | -3,75                 | 8,89                 | 13,64                 | 123         |

| <b>Bảng 19: Tiêu diệt đối hướng đối với tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNcap</b> |                       |                      |                       |             |
|----------------------------------------------------------------------------------|-----------------------|----------------------|-----------------------|-------------|
| <b>mAb</b>                                                                       | <b>Không có DART™</b> | <b>Có TCR-UDART™</b> | <b>Có CD16-UDART™</b> | <b>FACS</b> |
|                                                                                  | <b>Trung bình</b>     | <b>Trung bình</b>    | <b>Trung bình</b>     | <b>MFI</b>  |
| <b>PRCA157</b>                                                                   | 1,05                  | 17,07                | 15,43                 | 16,4        |
| <b>PSMA</b>                                                                      | 11,52                 | 31,38                | 34,79                 |             |
| <b>PSMA</b>                                                                      | 52,82                 | 71,19                | 66,04                 |             |
| <b>RECA13</b>                                                                    | 5,86                  | 22,55                | 15,40                 | 37          |
| <b>RECA22</b>                                                                    | 7,33                  | 24,65                | 23,54                 | 22,5        |
| <b>RECA9</b>                                                                     | 27,67                 | 52,54                | 45,14                 | 5,3         |
| <b>SAL1</b>                                                                      | 2,76                  | 17,87                | 44,52                 | 6,5         |
| <b>SAL2</b>                                                                      | 8,71                  | 30,68                | 29,17                 | 14,5        |
| <b>SAL3</b>                                                                      | 43,79                 | 92,60                | 76,46                 | 105         |
| <b>SG24</b>                                                                      | 12,64                 | 66,82                | 44,99                 |             |
| <b>SG27</b>                                                                      | 1,37                  | 55,30                | 16,96                 |             |
| <b>SKIN2</b>                                                                     | -2,04                 | 14,81                | 24,23                 | 73,8        |
| <b>SPL16</b>                                                                     | 9,97                  | 29,90                | 23,74                 | 5,2         |
| <b>STO5</b>                                                                      | -1,48                 | 21,11                | 24,97                 | 61,3        |
| <b>TDH28</b>                                                                     | -4,23                 | 18,55                | 15,04                 | 13,3        |
| <b>TDH36</b>                                                                     | 3,58                  | 19,61                | 19,79                 | 199         |
| <b>TDH37</b>                                                                     | 7,90                  | 18,78                | 25,22                 | 57,3        |
| <b>TDH4</b>                                                                      | 14,48                 | 37,96                | 54,64                 | 45,2        |
| <b>TDH40</b>                                                                     | 8,51                  | 44,55                | 43,87                 | 79,3        |
| <b>TDH5</b>                                                                      | 7,35                  | 48,71                | 38,15                 | 29,1        |
| <b>TDH6</b>                                                                      | 4,50                  | 54,59                | 19,73                 | 41,7        |
| <b>TES7</b>                                                                      | 50,15                 | 94,47                | 73,40                 | 22,4        |

#### Ví dụ 5

Khả năng của mAB B7-H3 trong việc liên kết với B7H3-2Ig dễ tan và B7H3-4Ig dễ tan

Như nêu trên, B7-H3 tồn tại trong cả dạng chứa miền 4 Ig (B7H3-4Ig) và dạng chứa miền 2 Ig (B7H3-2Ig). Kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế được thử nghiệm về khả năng của chúng trong việc liên kết với B7-H3 B7H3-2Ig dễ tan (Fig.4A) và B7H3-4Ig dễ tan (Fig.4B). Kháng thể được phát hiện ra là biểu hiện hàng loạt các đặc tính liên kết. Kháng thể PRCA123, TDH5, BLA8, BRCA68D và SG24 được phát hiện ra là biểu hiện liên kết mạnh nhất với B7H3-2Ig dễ tan và các kháng thể TES7, LUCA50, BRCA165, OVCA22, STO9 và PA20 được phát hiện ra là biểu hiện liên kết yếu nhất với B7H3-2Ig dễ tan. Kháng thể PRCA123, BRCA69A, BLA8 và BRCA68D được phát hiện ra là biểu hiện liên kết mạnh nhất với B7H3-4Ig dễ tan và kháng thể TES7, OVCA21, BRCA165 và STO9 được phát hiện ra là biểu hiện liên kết yếu nhất

với B7H3-4Ig dễ tan.

#### Ví dụ 6

Sự liên kết bằng ái lực của kháng nguyên trong dung dịch với kháng thể đơn dòng được bắt giữ

Để chứng minh ái lực liên kết giữa kháng nguyên trong dung dịch và kháng thể đơn dòng được bắt giữ, thì các kháng thể được bắt giữ trên các mảnh Fab2 đặc hiệu IgG Fc cố định ở mức 100-200 RU. Kháng nguyên B7-H3 và B7-H3(4Ig) được tiêm lên trên kháng thể được bắt giữ ở nồng độ bằng 100nM (tốc độ dòng chảy 20  $\mu$ l/phút trong 120 giây và liên kết được xác định. Các đáp ứng liên kết được chuẩn hóa đến cùng một mức mAb được bắt giữ và đáp ứng liên kết với đối chứng kháng thể m2B6 (mIgG1) được trừ đi làm mẫu trống. Các kết quả của phân tích này (Fig.5A-Fig.5S; đường nét liền; B7-H3(4Ig) 100 nM; đường nét đứt; B7-H3, 100 nM)) chứng minh rằng các kháng thể theo sáng chế biểu hiện sự liên kết mạnh với B7-H3(4Ig).

#### Ví dụ 7

Phân tích BIACORE <sup>TM</sup>: Độ chuẩn của mAB B7-H3 đối với B7-H3 cố định

Để chứng minh ái lực liên kết tương đối của B7-H3-2Ig và B7-H3-4Ig đối với các kháng thể theo sáng chế, phân tích BIACORE <sup>TM</sup> được tiến hành. Kháng thể B7-H3 theo sáng chế được cho phép liên kết với B7-H3-2Ig cố định hoặc với B7-H3-4Ig và độ chuẩn của liên kết theo thời gian được đánh giá (Fig.6A-Fig.6I). TDH5, PRCA123, BLA8, BRCA69 được phát hiện ra là có ái lực cao đối với cả B7-H3-2Ig và B7-H3-4Ig. Tuy nhiên (các) epitop của chúng được phát hiện ra là chủ yếu bị chặn trong phân tử B7-H3-4Ig, chỉ với một vài epitop là có sẵn. OVCA22 được phát hiện ra là có ái lực rất thấp đối với cả B7-H3-2Ig và B7-H3-4Ig với epitop của nó đều có sẵn trên cả hai phân tử. Tuy nhiên, có thể là chỉ có dạng B7-H3-4Ig mới đem lại đủ độ gần cho liên kết hóa trị hai của kháng thể (tốc độ tách thấp), trong khi đó B7-H3-2Ig có thể chỉ liên kết hoá trị một. TDH6 được phát hiện ra là rõ ràng có ái lực bất kỳ ở mô hình này, với liên kết với 2Ig có thể là không đặc hiệu. TES7 và PA20 được phát hiện ra là kháng thể đặc hiệu B7-H4-4Ig với ái lực thấp. TES7 có thể có tốc độ liên kết thấp và tốc độ tách cao hơn so với PA20. BRCA84D được phát hiện ra là kháng thể ái lực trung bình với khả năng

có nhiều vị trí liên kết trên cả B7-H3-2Ig và B7-H3-4Ig. Dựa trên phân tích BIACORE™, BRCA84D do vị trí liên kết không thường xuyên của nó được coi là kháng thể ưu tiên. TES7 và PA20 được coi là ứng viên để liên kết đặc hiệu với các bề mặt kháng nguyên mật độ cao và một trong các kháng thể ái lực cao-độ đặc hiệu thấp (ví dụ, BRCA69D hoặc một kháng thể khác).

Fig.7 thể hiện phân tích BIACORE™ so sánh giữa các kháng thể PRCA157, BRCA69D, BLA8, PA20, BRCA84D, GB8 và SG27, minh họa rằng kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế có thể biểu hiện hàng loạt tính chất liên kết.

Fig.8 thể hiện độ đặc hiệu không cạnh tranh của một vài kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế. Trong thử nghiệm này, phân tử B7-H3 của người được ủ với sự có mặt của kháng thể BRCA84D và được đưa vào phân tích BIACORE™. Sau khoảng 3 phút, kháng thể kháng B7-H3 thứ hai được bổ sung vào phản ứng. Nếu kháng thể thứ hai cạnh tranh với BRCA84D, thì sẽ phát hiện ra là vị trí B7-H3 bị bít và không thể liên kết. Các kết quả chỉ ra rằng kháng thể BRCA68D, BRCA69D và PRCA157 không cạnh tranh với BRCA84D để liên kết với B7-H3 của người.

#### Ví dụ 8

mAB kháng B7-H3 thu nhận trên dòng tế bào CSC và ATCC

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 theo sáng chế trong việc bắt đầu thu nhận khi liên kết với tế bào ung thư được nghiên cứu. Tế bào CSC tuyến tiền liệt và tế bào tụy Hs700t được ủ với kháng thể kháng B7-H3. Khả năng sống của các tế bào này được xác định sau khi ủ với sự có mặt của kháng thể thứ cấp kháng chuột nhất tiếp hợp saporin mà có độc đối với các tế bào này nếu liên kết với kháng thể sơ cấp và được thu nhận. Các kết quả của nghiên cứu này đối với tế bào CSC tuyến tiền liệt (Fig.9A) và đối với tế bào tụy Hs700t (Fig.9B) chứng minh khả năng của kháng thể theo sáng chế trong việc bắt đầu thu nhận vào tế bào.

#### Ví dụ 9

Phân tích sự liên kết và phong bế chéo của mAB B7-H3 bằng ELISA

Để nghiên cứu về tính phản ứng chéo của các kháng thể theo sáng chế và các epitop được nhận dạng bởi các kháng thể này, thì mức độ liên kết diễn ra khi có mặt

kháng thể B7-H3 cạnh tranh sẽ được đo. Các kết quả của phân tích này được thể hiện trên Fig.10A-Fig.10F và cho thấy rằng BRCA68D cạnh tranh với BRCA69D. TES7 và OVCA22 còn được phát hiện ra là cạnh tranh với nhau, nhưng TES7 được phát hiện là còn cạnh tranh với cả BRCA68D và BRCA69D nhưng OVCA22 thì không. GB8 được phát hiện là cạnh tranh với SG27 để liên kết với B7-H3-2Ig nhưng B7-H3-4Ig thì không. Số liệu được tóm tắt trong Bảng 20 và thể hiện ít nhất bốn epitop riêng biệt đối với B7-H3-4Ig (tức là epitop được nhận dạng bởi SG27, epitop được nhận dạng bởi GB8, epitop được nhận dạng bởi OVCA22 và TES7 và epitop được nhận dạng bởi BRCA68D, BRCA69D và TES7) và ít nhất hai epitop đối với B7-H3-2Ig (tức là epitop được nhận dạng bởi SG27 và GB8 và epitop được nhận dạng bởi BRCA68D và BRCA69D).

| <b>Bảng 20</b>                                                              |                                           |                 |                 |             |                |                  |                 |                 |
|-----------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------|-----------------|-----------------|-------------|----------------|------------------|-----------------|-----------------|
| <b>Tóm tắt phân tích về khả năng phong bế chéo của mAb B7-H3 bằng ELISA</b> |                                           |                 |                 |             |                |                  |                 |                 |
| <b>Kháng thể cạnh tranh</b>                                                 | <b>Kháng thể (% Liên kết so với MIgG)</b> |                 |                 |             |                |                  |                 |                 |
|                                                                             | <b>B7-H3 4Ig</b>                          |                 |                 |             |                | <b>B7-H3-2Ig</b> |                 |                 |
|                                                                             | <b>GB8</b>                                | <b>BRCA 69D</b> | <b>BRCA 68D</b> | <b>TES7</b> | <b>OVCA 22</b> | <b>GB8</b>       | <b>BRCA 69D</b> | <b>BRCA 68D</b> |
| <b>GB8</b>                                                                  | 50,211                                    | 119,105         | 108,948         | 87,480      | 98,142         | 26,618           | 84,408          | 94,710          |
| <b>TES7</b>                                                                 | 111,234                                   | 109,390         | 108,425         | 1,605       | 16,268         | 100,645          | 90,734          | 99,515          |
| <b>OVCA22</b>                                                               | 121,783                                   | 112,322         | 100,813         | 3,371       | 2,048          | 100,423          | 87,991          | 102,766         |
| <b>TDH6</b>                                                                 | 105,591                                   | 105,065         | 100,494         | 99,839      | 96,701         | 100,089          | 66,086          | 100,728         |
| <b>SG27</b>                                                                 | 101,266                                   | 103,021         | 97,763          | 78,331      | 87,789         | 64,421           | 89,927          | 94,225          |
| <b>BRCA68D</b>                                                              | 105,934                                   | 40,284          | 43,144          | 4,815       | 102,655        | 98,888           | 7,635           | 7,425           |
| <b>BRCA69D</b>                                                              | 102,558                                   | 66,291          | 71,441          | 4,334       | 96,928         | 94,952           | 17,346          | 17,059          |
| <b>MIgG</b>                                                                 | 100,000                                   | 100,000         | 100,00          | 100,000     | 100,000        | 100,000          | 100,000         | 100,000         |

Các thuộc tính của kháng thể kháng B7-H3 then chốt của sáng chế được thể hiện trong Bảng 21 Dựa trên sự nhuộm biệt hóa các mô bình thường và mô ung thư được biểu hiện của chúng, khả năng liên kết của chúng với B7-H3-4Ig cũng như B7-H3-2Ig, các ái lực liên kết của chúng như đo được bằng phân tích BIACORE™ mô tả ở trên và khả năng của chúng trong việc liên kết với B7H3 của khi đuôi dài, kháng thể, BRCA68D, BRCA69D, BRCA84D và PRCA157 được đánh giá là các kháng thể được ưu tiên nhất.

| <b>Bảng 21</b> |                 |              |             |                 |                 |            |              |                |                 |
|----------------|-----------------|--------------|-------------|-----------------|-----------------|------------|--------------|----------------|-----------------|
| <b>mAb</b>     | <b>BRCA 84D</b> | <b>TDH 6</b> | <b>TES7</b> | <b>BRCA 68D</b> | <b>BRCA 69D</b> | <b>GB8</b> | <b>SG 27</b> | <b>OVCA 22</b> | <b>PRCA 157</b> |
| <b>Isotyp</b>  | G1/k            | G1/k         | G1/k        | G1/k            | G1/k            | G1/k       | 2b/k         | G1/k           | G1/k            |
| <b>IHC</b>     | 2a              | 2a           | 2a          | 2b              | 2b              | 2b         | 2b           | 2c             | 2c              |



| <b>Bảng 21</b>                                         |                     |                  |             |                     |                     |            |                  |                    |                     |
|--------------------------------------------------------|---------------------|------------------|-------------|---------------------|---------------------|------------|------------------|--------------------|---------------------|
| <b>mAb</b>                                             | <b>BRCA<br/>84D</b> | <b>TDH<br/>6</b> | <b>TES7</b> | <b>BRCA<br/>68D</b> | <b>BRCA<br/>69D</b> | <b>GB8</b> | <b>SG<br/>27</b> | <b>OVCA<br/>22</b> | <b>PRCA<br/>157</b> |
| <b>Dây ATCC</b>                                        | 2                   | 1                | 1           | 3                   | 3                   | 3          | 1                | 3                  | 2                   |
| <b>Mô bình thường</b>                                  |                     |                  |             |                     |                     |            |                  |                    |                     |
| <b>Ruột kết</b>                                        | 1+                  | 1+               |             |                     | 1+                  |            | 1+               | 2+                 | 2+                  |
| <b>Phổi</b>                                            | 1+                  | 1+               |             | 1+                  |                     |            |                  |                    |                     |
| <b>Gan</b>                                             | 1+                  | 1+               |             | 2+                  | 2+                  |            | 1+               | 2+                 | 2+                  |
| <b>Thận</b>                                            |                     | 1+               |             | 1+                  | 1+                  |            | 1+               |                    |                     |
| <b>Tụy</b>                                             |                     | 1+               |             | 1+                  |                     |            | 1+               | 2+                 |                     |
| <b>Da</b>                                              |                     |                  |             |                     |                     |            |                  |                    | 2+                  |
| <b>Mô ung thư</b>                                      |                     |                  |             |                     |                     |            |                  |                    |                     |
| <b>Ruột kết</b>                                        | 1231*               | 1110*            | 1,5         | 2321*               | 2231*               |            | 1221*            | 1122               | 2231*               |
| <b>Phổi</b>                                            | 1130                | 1010             | 1,75        | 3332                | 3231                |            | 1120             | 3131**             | 3231                |
| <b>Tuyến tiền<br/>liệt</b>                             | 112                 | 111              | 3           | 333                 | 333                 |            | 222              | 222                | 333                 |
| <b>Vú</b>                                              | 1111                | 1011             | 3           | 3333                | 3333                |            | 1122             | 3233               | 2333                |
| <b>Thu nhận</b>                                        | +                   | +                | +           | +                   | +                   | +          | +                | +                  | +                   |
| <b>U-DART™</b>                                         | +                   | +                | +           | +                   | +                   | +          | +                | +                  | +                   |
| <b>Độ đặc hiệu</b>                                     | 4Ig<br>2Ig          | 4Ig<br>2Ig       | 4Ig         | 4Ig<br>2Ig          | 4Ig<br>2Ig          | 4Ig<br>2Ig | 4Ig<br>2Ig       | 4Ig                | 4Ig<br>2Ig          |
| <b>Nhóm epitop</b>                                     | A                   | B                | C           | D                   | D                   | E          | F                | G                  | H                   |
| <b>BIACORE™</b>                                        | +                   | +/-              | +           | ++                  | ++                  | +          | +                | +                  | +/-                 |
| <b>Khí đuôi dài<br/>Liên kết B7-<br/>H3</b>            | ++                  | +                | -           | ++                  | ++                  | ++         | +                | +                  | ++                  |
| <b>Lưu ý:</b> * chỉ sự nhuộm mô đậm ** nhuộm mô đậm 3+ |                     |                  |             |                     |                     |            |                  |                    |                     |

Ví dụ 10

Kháng thể kháng B7-H3 được biến đổi giống như của người

Kháng thể đơn dòng BRCA84D được biến đổi giống như của người để tạo ra kháng thể (được gọi chung là “hBRCA84D”) mang lại tiềm năng trị liệu cải thiện ở người. Các trình tự của chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi và các trình tự axit amin và polynucleotit tương ứng của chúng của kháng thể được biến đổi giống như của người thu được (được ký hiệu trong bản mô tả này là “hBRCA84D-1”) được nêu dưới đây:

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người (SEQ ID NO:68):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP  
GKAPKLLIYS

ASYRYSGVPS RFSGSGSGTD FTLTISSLQP EDFATYYCQQ  
YNNYPFTFGQ

GTKLEIK

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người (SEQ ID NO:69):

gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgctt ccgtgggcga  
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg  
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc  
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc  
tggcaccgac ttcaccctga ccctctccag cctgcagcct gaggacttcg  
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac ctccggccag  
ggcaccaagc tggaatcaa g

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR1 (SEQ ID NO:70): KASQNVDTNVA

Trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR1 (SEQ ID NO:71): aaggccagtc agaattgtga tactaatgta gcc

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR2 (SEQ ID NO:72): SASYRYS

Trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR2 (SEQ ID NO:73): tcggcatcct accggtacag t

Chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR3 (SEQ ID NO:74): QQYNNYPFT

Trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR3 (SEQ ID NO:75): cagcaatata acaactatcc attcacg

Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người (SEQ ID NO:80):

```
EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA
PGKGLEWVAY
ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED
TAVYYCARGR
ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS
```

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người (SEQ ID NO:81):

```
gaggtgcagc tggctgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc
cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca
tgactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac
atctctccg actctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag
gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga
actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac
cgtgaccgtg tcctct
```

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR1 (SEQ ID NO:82): FGMH

Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR1 (SEQ ID NO:83): ttggaatgcac

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D được biến đổi giống như của người CDR2 (SEQ ID NO:84): YISSDSSAIYYADTVK

Trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR2 (SEQ ID NO:85): tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag

Chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR3 (SEQ ID NO:86): GRENIYYGSRLDY

Trình tự polynucleotit mã hóa chuỗi nặng biến đổi của BRCA84D-1 được biến đổi giống như của người CDR3 (SEQ ID NO:87): gggagggaaa acattacta cggtagtagg cttgactac

Fig.11A-Fig.11B thể hiện việc sắp trình tự của gốc axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi (Fig.11A) hoặc chuỗi nặng biến đổi (Fig.11B) của BRCA84D và dẫn xuất được biến đổi giống như của người của nó là hBRCA84D.

Để thu được loại hBRCA84D biểu hiện ái lực cải thiện đối với B7-H3 của người, thì polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của hBRCA84D-1 (tức là hBRCA84D-1VL hoặc hBRCA84D-1VH, một cách tương ứng) được đưa vào quá trình gây đột biến và các dẫn xuất chuỗi nhẹ của hBRCA84D-1 đã được gây đột biến là hBRCA84D-2VL, hBRCA84D-3VL, hBRCA84D-4VL, hBRCA84D-5VL và hBRCA84D-6VL và các dẫn xuất chuỗi nặng của hBRCA84D-1 đã được gây đột biến là hBRCA84D-2VH, hBRCA84D-3VH và hBRCA84D-4VH được phân lập và đặc trưng hóa. Trình tự axit amin và trình tự polynucleotit của chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi của các kháng thể này được trình bày dưới đây:

hBRCA84D-2VL (SEQ ID NO:89):

|            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|
| DIQLTQSPSF | LSASVGDRVT | ITCKASQNVD | TNVAWYQQKP |
| GKAPKALIYS |            |            |            |
| ASYRYSGVPS | RFSGSGSGTD | FTLTISSLQP | EDFATYYCQQ |
| YNNYPFTFGQ |            |            |            |
| GTKLEIK    |            |            |            |

Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-2VL (SEQ ID NO:90):

gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga  
 cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg  
 cctggatatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc  
 gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc

tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg

ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag ggcaccaagc tggaaatcaa g

hBRCA84D-3VL (SEQ ID NO:91):

DIQLTQSPSF    LSASVGDRVS    VTCKASQNVD    TNVAWYQQKP  
GKAPKLLIYS

ASYRYSGVPS    RFSGSGSGTD    FTLTISSLQP    EDFATYYCQQ  
YNNYPFTFGQ

GTKLEIK

Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-3VL (SEQ ID NO:92):

gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga  
cagagtgtcc gtcacatgca aggctccca gaacgtggac accaacgtgg  
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc  
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc  
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg  
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag  
ggcaccaagc tggaaatcaa g

hBRCA84D-4VL (SEQ ID NO:93):

DIQLTQSPSF    LSASVGDRVT    ITCKASQNVD    TNVAWYQQKP  
GQAPKLLIYS

ASYRYSGVPS    RFSGSGSGTD    FTLTISSLQP    EDFATYYCQQ  
YNNYPFTFGQ

GTKLEIK

Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-4VL (SEQ ID NO:94):

gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga  
cagagtgacc atcacatgca aggctccca gaacgtggac accaacgtgg

cctggtatca gcagaagcct ggccaggccc ctaagctgct gatctactcc  
 gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc  
 tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg  
 ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac ctccggccag  
 ggcaccaagc tggaaatcaa g

hBRCA84D-5VL (SEQ ID NO:95):

|            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|
| DIQLTQSPSF | LSASVGDRVT | ITCKASQNVD | TNVAWYQQKP |
| GQAPKALIYS |            |            |            |
| ASYRYSGVPS | RFSGSGSGTD | FTLTISSLQP | EDFATYYCQQ |
| YNNYPFTFGQ |            |            |            |
| GTKLEIK    |            |            |            |

Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-5VL (SEQ ID NO:96):

gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca  
 cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg  
 cctggtatca gcagaagcct ggccaggccc ctaaggcgct gatctactcc  
 gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc  
 tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg  
 ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac ctccggccag  
 ggcaccaagc tggaaatcaa g

hBRCA84D-6VL (SEQ ID NO:97):

|            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|
| DIQLTQSPSF | LSASVGDRVT | ITCKASQNVD | TNVAWYQQKP |
| GKAPKLLIYS |            |            |            |
| ASYRYSGVPS | RFSGSGSGTD | FTLTISSLQP | EDFAEYYCQQ |
| YNNYPFTFGQ |            |            |            |
| GTKLEIK    |            |            |            |

Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-6VL (SEQ ID NO:98):

gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga  
 cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg  
 cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc  
 gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc  
 tggcaccgac ttcacctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg  
 ccgagtacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac ctccggccag  
 ggcaccaagc tggaaatcaa g

hBRCA84D-2VH (SEQ ID NO:99):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA  
 PGKGLEWVAY

ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED  
 TAVYYCGRGR ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS

Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-2VH (SEQ ID NO:100):

gaggtgcagc tggctgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc  
 cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca  
 tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac  
 atctctccg actctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag  
 gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac ctgcagatga  
 actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgg cagaggccgg  
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg tcctct

hBRCA84D-3VH (SEQ ID NO:101):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA  
 PGKGLEWVAY

ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRDED

TAMYYCGRGR

ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS

Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-3VH (SEQ ID NO:102):

gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc  
 cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca  
 tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac  
 atctctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag  
 gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctcctgtac ctgcagatga  
 actccctgcg ggacgaggac accgccatgt actactgcgg cagaggccgg  
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac  
 cgtgaccgtg tcctct

hBRCA84D-4VH (SEQ ID NO:103):

EVQLVESGGG LVQPGGSLRL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA  
 PGKGLEWVAY

ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNAKNSLY LQMNSLRSED  
 TAVYYCARGR

ENIYYGSRLD YWGQGTTVTV SS

Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-4VH (SEQ ID NO:104):

gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc  
 cctgagactg tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca  
 tgcactgggt ccgccaggct ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac  
 atctctccg actcctccgc catctactac gccgacaccg tgaagggcag  
 gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctcctgtac ctgcagatga  
 actccctgcg gagcaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg  
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac



cgtagccgtg tcctct

Bảng 22 liệt kê các đột biến được nghiên cứu của chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi của hBRCA84D; các ký tự số để chỉ hệ đánh số Kabat được sử dụng trên Fig.11A và Fig.11B.

| <b>Bảng 22</b>            |    |    |    |    |    |                            |    |    |    |
|---------------------------|----|----|----|----|----|----------------------------|----|----|----|
| <b>Chuỗi nhẹ biến đổi</b> |    |    |    |    |    | <b>Chuỗi nặng biến đổi</b> |    |    |    |
| <b>Vị trí Kabat</b>       | 20 | 21 | 42 | 46 | 85 | <b>Vị trí Kabat</b>        | 84 | 89 | 93 |
| <b>BRCA84D</b>            | S  | V  | Q  | A  | E  | <b>BRCA84D</b>             | S  | M  | G  |
| <b>hBRCA84D-1VL</b>       | T  | I  | K  | L  | T  | <b>hBRCA84D-1VH</b>        | D  | V  | A  |
| <b>hBRCA84D-2VL</b>       | T  | I  | K  | A  | T  | <b>hBRCA84D-2VH</b>        | D  | V  | G  |
| <b>hBRCA84D-3VL</b>       | S  | V  | K  | L  | T  | <b>hBRCA84D-3VH</b>        | D  | M  | G  |
| <b>hBRCA84D-4VL</b>       | T  | I  | Q  | L  | T  | <b>hBRCA84D-4VH</b>        | S  | V  | A  |
| <b>hBRCA84D-5VL</b>       | T  | I  | Q  | A  | T  |                            |    |    |    |
| <b>hBRCA84D-6VL</b>       | T  | I  | K  | L  | E  |                            |    |    |    |

Các ái lực liên kết tương đối của dẫn xuất chuỗi nhẹ của hBRCA84D là hBRCA84D-3VL, hBRCA84D-4VL và hBRCA84D-5VL đối với B7-H3 của người được xác định bằng cách tạo ra kháng thể chứa các vùng biến đổi chuỗi nhẹ này và chuỗi nặng BRCA84D-1VH thể khảm (Fig.12). BRCA84D-5VL (K42Q, L46A) được phát hiện ra là có ái lực liên kết cao nhất của hBRCA84D-VL được thử nghiệm. Do đó, BRCA84D-5VL được sử dụng làm chuỗi nhẹ để nghiên cứu về các ái lực liên kết tương đối của chuỗi nặng hBRCA84D của hBRCA84D-1VH, hBRCA84D-2VH,

hBRCA84D-3VH và hBRCA84D-4VH đối với B7-H3 của người (Fig.13). hBRCA84D-2VH (A93G) được phát hiện ra là có ái lực liên kết cao nhất của hBRCA84D-VH được thử nghiệm.

Trình tự axit amin và trình tự polynucleotit mã hóa của BRCA84D-1 thể khảm là như sau:

Chuỗi nhẹ chBRCA84D (SEQ ID NO: 105):

|            |            |            |            |
|------------|------------|------------|------------|
| DIAMTQSQKF | MSTSVGDRVS | VTCKASQNVD | TNVAWYQQKP |
| GQSPKALIYS |            |            |            |
| ASYRYSGVDP | RFTGSGSGTD | FTLTINNVQS | EDLAEYFCQQ |
| YNNYPFTFGS |            |            |            |
| GTKLEIKRTV | AAPSVFIFPP | SDEQLKSGTA | SVVCLLNNFY |
| PREAKVQWKV |            |            |            |
| DNALQSGNSQ | ESVTEQDSKD | STYSLSSTLT | LSKADYEKHK |
| VYACEVTHQG |            |            |            |
| LSSPVTKSFN | RGEC       |            |            |

Polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ chBRCA84D (SEQ ID NO: 106):

gacattgcga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga  
cagggtcagc gtcacctgca aggccagtca gaatgtggat actaatgtag  
cctggatatca acagaaacca gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg  
gcatcctacc ggtacagtgg agtcctgat cgcttcacag gcagtggatc  
tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcagtct gaagacttgg  
cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg  
gggacaaagt tggaataaaa acgtacgggtg gctgcacat ctgtctcat  
cttcccccca tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt  
gcctgctgaa taacttctat cccagagagg ccaaagtaca gtggaagggtg  
gataacgccc tccaatcggg taactcccag gagagtgtca cagagcagga

cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg ctgagcaaag

cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc

ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag

Chuỗi nặng chBRCA84D (SEQ ID NO: 107):

DVQLVESGGG LVQPGGSRKL SCAASGFTFS SFGMHWVRQA  
PEKGLEWVAY

ISSDSSAIYY ADTVKGRFTI SRDNPKNLTLF LQMTSLRSED  
TAMYYCGRGR

ENIYYGSRLD YWGQGTTTLTV SSASTKGPSV FPLAPSSKST  
SGGTAALGCL

VKDYFPEPVT VSWNSGALTS GVHTFPAVLQ SSGLYSLSSV  
VTVPSSSLGT

QTYICNVNHNK PSNTKVDKRV EPKSCDKTHT CPPCPAPELL  
GGPSVFLFPP

KPKDTLMISR TPEVTCVVVD VSHEDPEVKF NWYVDGVEVH  
NAKTKPREEQ

YNSTYRVVSV LTVLHQDWLN GKEYKCKVSN KALPAPIEKT  
ISKAKGQPRE

PQVYTLPPSR DELTKNQVSL TCLVKGFYPS DIAVEWESNG  
QPENNYKTTP

PVLDSGDGSFF LYSKLTVDKS RWQQGNVFSC SVMHEALHNNH  
YTQKSLSLSP

GK

Polynucleotit mã hoá chuỗi nặng chBRCA84D (SEQ ID NO: 108):

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc

ccggaaactc tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa

tgcactgggt tcgtcaggct ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatc  
attagtagtg acagtagtgc catctactat gcagacacag tgaagggccg  
attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc ctgcaaatga  
ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg  
gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac  
tctcacagtc tctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc tccccctgg  
caccctcctc caagagcacc tctgggggca cagcggccct gggctgcctg  
gtcaaggact acttccccga accggtgacg gtgtcgtgga actcaggcgc  
cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgcctacag tctcaggac  
tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc  
cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaaggtgga  
caagagagtt gagcccaaatt cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt  
gcccagcacc tgaactcctg gggggaccgt cagtcttctt cttccccca  
aaaccaagg acaccctcat gatctcccgg acccctgagg tcacatgcgt  
ggtaggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc aactggtacg  
tggaaggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag  
tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga  
ctggctgaat ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc  
cagcccccat cgagaaaacc atctcaaag ccaaagggca gccccgagaa  
ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccgg gatgagctga ccaagaacca  
ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatcccagc gacatcgccg  
tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct  
cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttct ctctacagca agctcaccgt  
ggacaagagc aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc  
atgaggctct gcacaaccac tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg

ggtaaata

Ái lực liên kết tương đối của kháng thể chứa: (1) hBRCA84D-2VL và hBRCA84D-2VH (hai thử nghiệm), (2) BRCA84D thể khảm, (3) kháng thể chứa hBRCA84D-5VL và BRCA84D-HC thể khảm và (4) kháng thể chứa hBRCA84D-5VL và hBRCA84D-2VH được so sánh. Các kết quả được thể hiện trên Fig.14.

#### Ví dụ 11

Kháng thể kháng B7-H3 được biến đổi giống như của người ức chế quá trình phát triển khối u trong các mô ghép khác loài

Để chứng minh khả năng của kháng thể kháng B7-H3 được biến đổi giống như của người trong việc ức chế sự phát triển khối u *in vivo*, sự phát triển khối u của tế bào caxinom bàng quang HT-1197 và tế bào caxinom thận A498 được nghiên cứu trong mô ghép ở chuột. Kháng thể được biến đổi giống như của người hBRCA84D-2 (chuỗi hBRCA84D-2 VL/chuỗi hBRCA84D-2 VL) được biến đổi để bao gồm vùng Fc có các đột biến thay thế L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L. Kháng thể hBRCA84D-2 được biến đổi Fc được dùng cho chuột nhắt (ở liều lượng là 1 µg/kg, 10 µg/kg, hoặc 20 µg/kg) 7 ngày, 14 ngày, 21 ngày và 28 ngày sau khi cấy tế bào ung thư. Các kết quả thể hiện rằng ở tất cả các liều, kháng thể hBRCA84D-2 được biến đổi Fc được sử dụng có khả năng ức chế sự phát triển khối u của tế bào caxinom bàng quang HT-1197 (Fig.15) và của tế bào caxinom thận A498 (Fig.16).

#### Ví dụ 12

Chất phản ứng đôi mục tiêu có ái lực kép (DART™) đặc hiệu đối với B7-H3 và thụ thể tế bào T

Điều tiết sự tiêu diệt tế bào T hoạt lực đã đổi hướng

Chất phản ứng đôi mục tiêu có ái lực kép (DART™s) đặc hiệu đối với B7-H3 và thụ thể tế bào T (“TCR”) và đối với thụ thể nhóm diệt tự nhiên (NKG2D) được điều chế. Các DART™ này có khả năng định vị vị trí tế bào T (bằng cách liên kết tế bào T này với phần liên kết TCR của DART™ liên kết TCR) hoặc định vị tế bào NK (bằng cách liên kết tế bào NK này với phần liên kết NKG2D của DART™ liên kết NKG2D) sang vị trí của tế bào ung thư (bằng cách liên kết tế bào ung thư này với phần liên kết

B7-H3 của DART™). Tế bào T hoặc tế bào NK đã định vị sau đó có thể điều tiết sự tiêu diệt tế bào ung thư trong quy trình ở đây gọi là tiêu diệt “đổi hướng”.

Chất phản ứng đổi mục tiêu có ái lực kép (DART™) đặc hiệu đối với B7-H3 và thụ thể tế bào T (“TCR”) được xây dựng cấu trúc có miền biến đổi kháng B7-H3 của hBRCA84D-2 và miền biến đổi kháng TCR:

Chuỗi TCR VL x hBRCA84D VH-2-DART™ cuộn E (SEQ ID NO: 109):

|                    |                   |            |                    |
|--------------------|-------------------|------------|--------------------|
| EIVLTQSPAT         | LSLSPGERAT        | LSCSATSSVS | YMHWYQQKPG         |
| KAPKRWIYDT         |                   |            |                    |
| SKLASGVPSR         | FSGSGSGTEF        | TLTISSLQPE | DFATYYCQQW         |
| SSNPLTFGQG         |                   |            |                    |
| TKLEIK <u>GGGS</u> | <u>GGGGEVQLVE</u> | SGGGLVQPGG | SLRLSCAASG         |
| FTFSSFGMHW         |                   |            |                    |
| VRQAPGKGLE         | WVAYISSDSS        | AIYYADTVKG | RFTISRDNAL         |
| NSLYLQMNSL         |                   |            |                    |
| RDEDTAVYYC         | GRGRENIYYG        | SRLDYWGQGT | TVTVSS <u>GGCG</u> |
| <u>GGEVAALEKE</u>  |                   |            |                    |
| <u>VAALEKEVAA</u>  | <u>LEKEVAALEK</u> |            |                    |

Polynucleotit mã hoá chuỗi TCR VL x hBRCA84D VH-2-DART™ cuộn E (SEQ ID NO: 110):

gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga  
aagagccacc ctctcctgca gtgccacctc aagtgttaagt tacatgcact  
ggtatcagca gaaaccaggg aaagccccta agcgctggat ctatgacaca  
tccaaactgg ctctggggt cccatcaagg ttcagcggca gtggatctgg  
gacagaattt actctcaca tcagcagcct gcagcctgaa gattttgcaa  
cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg  
accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gcgaggtgca

gctggtcgag tctggcggag gactggtgca gcctggcggc tccctgagac  
 tgtcttgcgc cgcctccggc ttcaccttct ccagcttcgg catgcaactgg  
 gtccgccagg ctccaggcaa gggactggaa tgggtggcct acatctctc  
 cgactctcc gccatctact acgccgacac cgtgaagggc aggttcacca  
 tctcccggga caacgccaag aactccctgt acctgcagat gaactccctg  
 cgggacgagg acaccgccgt gtactactgc ggcagaggcc gggagaatat  
 ctactacggc tcccggctgg attattgggg ccagggcacc accgtgaccg  
 tgtctccgg aggatgtggc ggtggagaag tggccgcact ggagaaagag  
gttgctgctt tggagaagga ggtcgtgca ctgaaaagg aggtcgcagc  
cctggagaaa

Chuỗi hBRCA84DVL-2 x TCR VH – cuộn K (SEQ ID NO: 111):

|                    |                    |            |                    |
|--------------------|--------------------|------------|--------------------|
| DIQLTQSPSF         | LSASVGDRVT         | ITCKASQNVD | TNVAWYQQKP         |
| GKAPKALIYS         |                    |            |                    |
| ASYRYSGVPS         | RFSGSGSGTD         | FTLTISSLQP | EDFATYYCQQ         |
| YNNYPFTFGQ         |                    |            |                    |
| GTKLEIK <u>GGG</u> | <u>SGGGG</u> QVQLV | QSGAEVKKPG | ASVKVSCCAS         |
| GYKFTSYVMH         |                    |            |                    |
| WVRQAPGQGL         | EWIGYINPYN         | DVTKYNEKFK | GRVTITADKS         |
| TSTAYLQMNS         |                    |            |                    |
| LRSEDTAVHY         | CARGSYDYD          | GFVYWGQGTL | VTVSS <u>GGCGG</u> |
| <u>GKVAALKEKV</u>  |                    |            |                    |
| <u>AALKEKVAAL</u>  | <u>KEKVAALKE</u>   |            |                    |

Polynucleotit mã hoá chuỗi hBRCA84DVL-2 x TCR VH – cuộn K (SEQ ID NO: 112):

gacatccagc tgaccagtc cccctcttc ctgtctgct cctgggcga  
 cagagtgacc atcacatgca aggcctcca gaacgtggac accaacgtgg

cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc  
 gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc  
 tggcaccgac ttcacctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg  
 ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag  
 ggcaccaagc tggaaatcaa gggagggcga tccggcggcg gaggccaggt  
 tcagctgggtg cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga  
 aggtctcctg caaggccagc ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac  
 tgggtgcgac agggccctgg acaagggctt gagtggatcg gatatttaa  
 tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa ggcagagtca  
 cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacctgca gatgaacagc  
 ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta  
 tgattacgac gggtttgtt actggggcca agggactctg gtcactgtga  
 gctccggagg atgtggcgt ggaaaagtgg cgcactgaa ggagaaagtt  
gctgctttga aagagaaggt cggcgactt aaggaaaagg tcgcagccct  
gaaagag

Chất phản ứng đôi mục tiêu có ái lực kép (DART™) đặc hiệu đối với B7-H3 và  
 thụ thể nhóm diệt tự nhiên (NKG2D) được xây dựng cấu trúc có miền biến đổi kháng  
 B7-H3 của hBRCA84D-2 và miền biến đổi kháng TCR:

Chuỗi NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-DART™ cuộn E (SEQ ID NO: 113):

|            |                   |            |            |
|------------|-------------------|------------|------------|
| QSALTQPASV | SGSPGQSITI        | SCSGSSSNIG | NNAVNWYQQL |
| PGKAPKLLIY |                   |            |            |
| YDDLPSGVS  | DRFSGSKSGT        | SAFLAISGLQ | SEDEADYYCA |
| AWDDSLNGPV |                   |            |            |
| FGGGTKLTVL | <u>GGGSGGGGEV</u> | QLVESGGGLV | QPGGSLRLSC |
| AASGFTFSSF |                   |            |            |
| GMHWVRQAPG | KGLEWVAYIS        | SDSSAIYYAD | TVKGRFTISR |



DNAKNSLYLQ

MNSLRDEDTA VYYCGRGREN IYYGSRLDYW GQGTTVTVSS

GGCGGGEVAALEKEVAALEKE VAALEKEVA ALEK

Polynucleotit mã hoá chuỗi NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-DART™ cuộn E  
(SEQ ID NO: 114):

cagtctgccc tgactcagcc tgcctccgtg tctgggtctc ctggacagtc  
aatcaccatc tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg  
ttaactggtg ccagcagctc ccaggaaagg ctccaaact cctcatctat  
tatgatgacc tactgcctc aggggtctct gaccgattct ctggctcaa  
gtctggcacc tcagccttc tggccatcag tgggtccag tctgaggatg  
aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tggccagtg  
ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggaggcggat cggcggcgg  
aggcgaggtg cagctggctg agtctggcgg aggactggtg cagcctggcg  
gtccctgag actgtctgc gccgcctccg gcttcacctt ctccagcttc  
ggcatgcact gggtcgcca ggctccaggc aagggactgg aatgggtggc  
ctacatctcc tcgactcct ccgcatcta ctacgccgac accgtgaagg  
gcaggttcac catctccgg gacaacgcca agaactccct gtacctgcag  
atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg  
ccgggagaat atctactacg gctcccggct ggattattgg ggccagggca  
ccaccgtgac cgtgtcctcc ggaggatgtg gcggtggaga agtggccgca  
ctggagaaaag aggttctgc ttggagaag gagtcgctg cacttga  
ggaggtcgca gccctggaga aa

Chuỗi hBRCA84DVL-2 x NKG2D VH – cuộn K (SEQ ID NO: 115):

DIQLTQSPSF LSASVGDRVT ITCKASQNVD TNVAWYQQKP

GKAPKALIYS

ASYRYSGVPS      RFSGSGSGTD      FTLTISSLQP      EDFATYYCQQ  
YNNYPFTFGQ

GTKLEIKGGG      SGGGGQVQLV      ESGGGLVKPG      GSLRLSCAAS  
GFTFSSYGMH

WVRQAPGKGL      EWVAFIRYDG      SNKYYADSVK      GRFTISRDNS  
KNTLYLQMNS

LRAEDTAVYY      CAKDRGLGDG      TYFDYWGQGT      TVTVSSGGCG  
GGKVAALKEK

VAALKEKVAA LKEKVAALKE

Polynucleotit mã hoá chuỗi hBRCA84DVL-2 x NKG2D VH – cuộn K (SEQ ID  
NO: 116):

gacatccagc tgaccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga  
cagagtgacc atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg  
cctggtatca gcagaagcct ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc  
gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc aggttctccg gctccggctc  
tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct gaggacttcg  
ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac ctteggccag  
ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcgccg gaggccaggt  
acagctggtg gagtctgggg gaggcctggt caagcctgga gggtccctga  
gactctctg tgcagcgtct ggattcacct tcagtagcta tggcatgcac  
tgggtccgcc aggtccagg caaggggctg gagtgggtgg catttatacg  
gtatgatgga agtaataaat actatgcaga ctccgtgaag ggccgattca  
ccatctccag agacaattcc aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc  
ctgagagctg aggacacggc tgtgtattac tgtgcgaaag atcgaggtt  
gggggatgga acctacttg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg

tctcctccgg aggatgtggc ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa  
gttgctgctt tgaagagaa ggtcgccgca cttaaggaaa aggtcgcagc  
cctgaaagag

Để chứng minh khả năng của DART™ trong việc điều tiết sự tiêu diệt đối hướng các tế bào ung thư như vậy, DART™ hBRCA84D-2/kháng TCR (“T-DART™”) mô tả ở trên, hBRCA84D-2, hBRCA84D-2 (được biến đổi Fc: L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L), và đối chứng TCR-DART™ được ủ ở các nồng độ khác nhau với các tế bào ung thư đích (tế bào ung thư phôi SK-MES-1, tế bào caxinom thận A498, tế bào ung thư tuyến tiền liệt LNCap, hoặc tế bào ung thư hắc tố UACC-62) và PBMC tạm ngừng tác động (tỷ lệ E:T = 30:1) và tính gây độc tế bào được xác định (thử nghiệm LDH). Các kết quả của nghiên cứu này được thể hiện trên Fig.17A-Fig.17D và chứng minh khả năng của DART™ hBRCA84D-2/kháng TCR (“T-DART™”) trong việc điều tiết sự tiêu diệt đối hướng của các tế bào ung thư.

#### Ví dụ 13

Profin được động học trong chuột nhất không có khối u

Kháng thể kháng B7-H3 (Mab1) được tiêm vào chuột nhất đực mCD16-/-, hCD16A\_FOXN1 (5 mg/kg; IV) và huyết thanh được thử nghiệm (định liều trước và ) ở 2, 15, 30 phút và 1, 2, 4, 6 giờ và 1, 2, 3, 6, 8, 14, 21 và 28 ngày sau khi tiêm. Kháng thể này được phát hiện ra là có T<sub>1/2</sub> bằng 10,54 ngày và C<sub>max</sub> bằng 43,493 µg/mL. Nồng độ của kháng thể theo thời gian được thấy là hai pha, khớp vào mô hình hai thành phần (Fig.18A-Fig.18B). Profin được động học theo dự đoán tạo ra bằng cách sử dụng mô hình 2 thành phần với các thông số từ liều 5 mg/kg được thể hiện trên Fig.18C.

#### Ví dụ 14

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc liên kết với tế bào ung thư bàng quang HT-1197

và ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột

Kháng thể kháng B7-H3 (Mab1) mô tả ở trên được đánh giá về khả năng của nó trong việc liên kết HT-1197, dòng tế bào caxinom bàng quang biểu hiện B7-H3 của người. Như được thể hiện trên Fig.19, các tế bào này có sự biểu hiện PRCA135 lớn hơn

so với sự biểu hiện HER2 và như vậy đặc biệt thích hợp để đánh giá khả năng trị liệu của kháng thể theo sáng chế trong việc điều tiết lại khối u HT-1197. Theo kết luận này, biến thể hBRCA84D của kháng thể kháng B7-H3 được phát hiện ra là có khả năng liên kết với tế bào HT-1197. Fig.20 thể hiện ái lực liên kết của kháng thể Mab1 với tế bào HT-1197.

Chuột nhắt (mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào HT-1197 dưới da bên sườn với lượng  $8 \times 10^6$ . Tế bào khối u được cấy trong 200  $\mu$ l môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy qua IV Q7D x5 bằng cách sử dụng các liều là 0,1, 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg (tám con chuột nhắt cái mỗi liều). Centuximab (kháng thể kháng EGFR) được dùng cho nhóm chuột nhắt đối chứng ở liều 1, 5 hoặc 15 mg/kg (tám con chuột nhắt cái mỗi liều). Tám con chuột nhắt cái cũng được tiêm chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 10mg/kg. Các phép đo khối u được thực hiện mỗi 3 đến 4 ngày. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.21A) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển của khối u bằng quang trong mô hình ghép khác loài ở chuột. Fig.21B thể hiện các kết quả thu được bằng cách sử dụng centimab. So sánh giữa Fig.21A và Fig.21B chứng minh rằng kháng thể theo sáng chế hữu hiệu hơn so với centimab trong việc ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển của khối u bằng quang trong mô hình ghép khác loài ở chuột. Fig.21C so sánh kết quả thu được ở liều tối đa được thử nghiệm.

#### Ví dụ 15

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc liên kết tế bào ung thư bằng quang HT-1376 và ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột

Kháng thể kháng B7-H3 (Mab1) mô tả ở trên được đánh giá về khả năng của nó trong việc liên kết HT-1376, dòng tế bào caxinom bằng quang biểu hiện B7-H3 của người. Như được thể hiện trên Fig.22A-Fig.22B, các tế bào này có sự biểu hiện PRCA135 lớn hơn so với sự biểu hiện HER2 hoặc PMSA và như vậy đặc biệt thích hợp để đánh giá khả năng trị liệu của kháng thể theo sáng chế trong việc điều tiết lại khối u HT-1376. Theo kết luận này, biến thể hBRCA84D của kháng thể kháng B7-H3 được phát hiện ra là có khả năng liên kết với tế bào HT-1197. Fig.22A-Fig.22B thể hiện ái

lực liên kết của kháng thể Mab1 với tế bào HT-1197.

Chuột nhắt (mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào HT-1376 dưới da bên sườn với lượng  $5 \times 10^6$ . Tế bào khối u được cấy trong 200  $\mu$ l môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy thông qua IV Q7D x4 ở liều 1 mg/kg. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.23) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển của khối u bằng quang trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

#### Ví dụ 16

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc liên kết tế bào ung thư

Kháng thể kháng B7-H3 BRCA84D được đánh giá thông qua phân tích FACS về khả năng của nó trong việc liên kết: tế bào ung thư đại trực tràng SW480 và SW620; tế bào ung thư dạ dày AGS; tế bào ung thư hắc tố M-14 và LOX IMVI ; tế bào ung thư tuyến tiền liệt 22rv; tế bào ung thư tụy tế bào AsPC-1 và BxPc-3; tế bào ung thư thận A498 và 786-0. Kháng thể này được phát hiện ra là có thể liên kết với tất cả các tế bào đó.

#### Ví dụ 17

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển của khối u dạ dày ở mô hình ghép khác loài ở chuột

Chuột nhắt (mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào AGS dưới da bên sườn với lượng  $5 \times 10^6$ . Tế bào khối u được cấy trong 200  $\mu$ l môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy qua IV Q7D x5 bằng cách sử dụng các liều là 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Các kết quả của thử nghiệm (Fig.24) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u dạ dày trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

#### Ví dụ 18

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc liên kết tế bào ung thư phổi và ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột

Tế bào ung thư phổi A549 được ủ với sự có mặt của hBRCA84D, chBRCA84D

và biến thể hBRCA84 (0264 Fc) và tác dụng gây độc tế bào của các kháng thể này được xác định. Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.25 và chỉ ra rằng tất cả ba trong số các kháng thể có tính gây độc tế bào đối với tế bào A549.

Chuột nhắt (mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào A549 dưới da bên sườn với lượng  $8 \times 10^6$ . Tế bào khối u được cấy trong 200  $\mu$ l môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy qua IV Q7D x4 bằng cách sử dụng liều là 1 mg/kg. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.26) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u ung thư phổi trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

Phân tích FACS được tiến hành đối với các tế bào ung thư phổi CaLu3 để xác định việc liệu các tế bào này có liên kết với kháng thể kháng B7-H3 hay không. Thử nghiệm này đã khẳng định rằng các tế bào này biểu hiện B7-H3 và liên kết với kháng thể theo sáng chế. Để xác định việc liệu kháng thể theo sáng chế có hiệu quả trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u ung thư phổi hay không, thì chuột nhắt (mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào CaLu3 dưới da bên sườn với  $5 \times 10^6$ . Tế bào khối u được cấy trong 200  $\mu$ l môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy qua IV Q7D x4 bằng cách sử dụng liều là 0,5, 1, hoặc 5 mg/kg. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.27) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u ung thư phổi trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

#### Ví dụ 19

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u hắc tố LOX trong mô hình ghép khác loài ở chuột

Chuột nhắt (tám con cái mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy dưới da bên sườn với tế bào ung thư hắc tố LOX-IMVI và sau đó được cấy truyền IV/Q7D x3 với đối chứng PBS, đối chứng IgG (5/mg/kg), Mab1 (0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg), hoặc IP/BIWx2 với Docetaxel (5, 10 hoặc 20 mg/kg). Tế bào khối u được cấy trong 200  $\mu$ l môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.28A-Fig.28C) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát

triển khối u ung thư hắc tố trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

#### Ví dụ 20

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển của khối u ung thư hắc tố UACC-62 trong mô hình ghép khác loài ở chuột

Chuột nhắt (tám con cái mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào ung thư hắc tố UACC-62 dưới da bên sườn và sau đó được cấy truyền IV/Q7D x5 với đối chứng PBS, đối chứng IgG (5/mg/kg) hoặc Mab1 (0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg). Tế bào khối u được cấy trong 200  $\mu$ l môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.29) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u ung thư hắc tố u trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

#### Ví dụ 21

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u tuyến tiền liệt 22rv trong mô hình ghép khác loài ở chuột

Chuột nhắt (mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào ung thư tuyến tiền liệt 22rv dưới da bên sườn với lượng  $6 \times 10^6$  và sau đó được cấy truyền IV/Q7D x4 với đối chứng PBS, IgG (10mg/kg), Mab1 (0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg; Q7D x5) hoặc trastuzumab (1. 7 hoặc 15 mg/kg). Tế bào khối u được cấy trong 200  $\mu$ l môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig30A-Fig.30C) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u ung thư tuyến tiền liệt trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

#### Ví dụ 22

Khả năng của kháng thể kháng B7-H3 trong việc liên kết tế bào ung thư thận và ngăn ngừa hoặc ức chế sự phát triển khối u trong mô hình ghép khác loài ở chuột

Tế bào ung thư thận A498 được ủ với sự có mặt của hBRCA84D, chBRCA84D và biến thể hBRCA84 (0264 Fc) và tác dụng gây độc tế bào của các kháng thể này được xác định. Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.31 và chỉ ra rằng tất cả ba trong số các kháng thể này có tính gây độc tế bào đối với tế bào A498.

Tế bào ung thư thận A498 được ủ với sự có mặt của hBRCA84D, chBRCA84D và biến thể hBRCA84 (0264 Fc) và tác dụng gây độc tế bào của các kháng thể này được xác định. Các kết quả của thử nghiệm này được thể hiện trên Fig.31 và chỉ ra rằng tất cả ba trong số các kháng thể này có tính gây độc tế bào đối với tế bào A498.

Phân tích IHC của mô khối u ghép khác loài A498 được tiến hành bằng cách sử dụng kháng thể BRCA84D được biotinyl hoá (20 µg/mL), BRCA69D (5 µg/mL) và kháng thể kháng Her2 (20 µg/mL). Kháng thể BRCA84D được phát hiện ra là liên kết với 20-40% mô khối u (từ yếu đến vừa phải: + hoặc ++); BRCA69D được phát hiện ra là liên kết với 80-100% mô khối u (từ vừa phải đến mạnh: ++ hoặc +++). Kháng thể BRCA84D được phát hiện ra là liên kết yếu với 40% mô khối u UMUC-3 (+); BRCA69D được phát hiện ra là liên kết vừa phải hoặc mạnh với 70% mô khối u này (++ hoặc +++); kháng thể kháng Her2 được phát hiện ra là liên kết đa dạng với 20% mô khối u này (+ -+++). Là đối chứng, kháng thể kháng Her2 được phát hiện là liên kết với tế bào SKBR-3 (+++) và BRCA84D và BRCA69D được phát hiện là có khả năng liên kết với tế bào Hs 700T (+++)

Chuột nhắt (mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào ung thư A498 dưới da bên sườn với  $5 \times 10^6$ . Tế bào khối u được cấy trong 200 µl môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy thông qua IV Q7D x5 bằng cách sử dụng các liều là 0,1, 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Centuximab (kháng thể kháng EGRF) được dùng cho nhóm chuột nhắt đối chứng ở liều 1, 7, hoặc 15 mg/kg. Chuột nhắt đối chứng bổ sung được tiêm chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 10mg/kg. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.32) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u ung thư thận trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

Chuột nhắt (mCD16<sup>-/-</sup>, hCD16A<sup>+</sup>\_FoxN1) được cấy tế bào ung thư 786-0 dưới da bên sườn theo cách khác với lượng  $5 \times 10^6$ . Tế bào khối u được cấy trong 200 µl môi trường F12 của Ham được pha loãng theo tỷ lệ 1:1 với MATRIGEL™. Việc điều trị bằng Mab1 được bắt đầu trong vòng 7 ngày cấy thông qua IV Q7D x5 bằng cách sử dụng các liều là 0,1, 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Centuximab (kháng thể kháng EGRF) được dùng cho nhóm chuột nhắt đối chứng ở liều 1, 7, hoặc 15 mg/kg. Chuột nhắt đối chứng



bổ sung được tiêm chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 10mg/kg. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.33A-Fig.33B) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u ung thư thận trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

Hoạt tính của Mab1 được so sánh với hoạt tính của paclitaxel, chất ức chế giãn phân được sử dụng trong liệu pháp hóa trị ung thư. Nhóm gồm tám con chuột nhắt cái (mCD16-/-, hCD16A+<sub>FoxN1</sub>) được cấy tế bào ung thư thận 786-0 dưới da bên sườn và sau đó được cung cấp Mab1 qua IV Q7D ở liều 0,1, 0,5, 1, 5 hoặc 10mg/kg. Paclitaxel được dùng cho nhóm đối chứng gồm tám con chuột nhắt như vậy ở liều 2,5 mg/kg vào ngày nghiên cứu 21, 28 và 35. Chuột nhắt đối chứng bổ sung (bảy con cái mỗi nhóm) được tiêm chất dẫn thuốc hoặc đối chứng IgG 5 mg/kg. Các kết quả của thử nghiệm này (Fig.34) cho thấy rằng Mab1 có khả năng ngăn chặn hoặc ức chế sự phát triển khối u ung thư thận trong mô hình ghép khác loài ở chuột.

#### Ví dụ 23

##### Nghiên cứu độc học ở khi đuôi dài

Nghiên cứu độc học ở khi đuôi dài được tiến hành để đánh giá profin độc học cấp tính sau một liều Mab1 duy nhất, xác định profin được động học cho Mab1, thiết lập mối quan hệ thời gian đối với liều để cảm ứng xytokin liên quan đến quá trình hoạt hoá tế bào tác động và đánh giá tác dụng của việc điều trị bằng thuốc đối với mức tuần hoàn tế bào bạch cầu (ví dụ, tế bào NK và tế bào T).

Nghiên cứu này có thể được thiết kế để bao gồm bốn nhóm gồm 6 con khi (3 đực và 3 cái) và kéo dài 7 tuần từ khi bắt đầu điều trị đến khi mổ tử thi cuối cùng. Nhóm 1 sẽ bao gồm nhóm đối chứng chỉ nhận chất dẫn thuốc trong tuần 1 và tuần 2. Bốn thành viên của nhóm 1 (hai đực và hai cái) sẽ được trợ tử ở tuần 3. Các thành viên còn lại của nhóm 1 sẽ nhận bổ sung chất dẫn thuốc ở tuần 3 và được trợ tử để mổ tử thi ở tuần 7. Các nhóm 2 đến 4 là nhóm thử nghiệm nhận chất dẫn thuốc ở tuần 1 và kháng thể B7-H3 (1, 30, hoặc 100 mg/kg, một cách tương ứng) ở tuần 2. Bốn thành viên của mỗi nhóm (hai đực và hai cái) sẽ được trợ tử ở tuần 3. Các thành viên còn lại của mỗi nhóm sẽ nhận bổ sung chất dẫn thuốc ở tuần 3 và được trợ tử để mổ tử thi ở tuần 7.

Tất cả các lần truyền đều được dung nạp tốt và không quan sát thấy có tử vong

hay thay đổi đáng kể về thể trọng, dấu hiệu lâm sàng hoặc hóa học huyết thanh. Quan sát thấy sự giảm tuần hoàn phụ thuộc theo liều ở tế bào NK nhưng không quan sát thấy sự giảm tuần hoàn đối với tế bào B và tế bào T.

Nghiên cứu này đưa ra sự xác minh cho khi đuôi dài dưới dạng loại độc học liên quan. Khi tiếp xúc với mô bình thường của người, thì kháng thể BRCA84D thể hiện các cường độ nhuộm khác nhau trong gan, tụy, ruột kết, phổi và vỏ thượng thận. Sự nhuộm gan bị hạn chế tương đối ở tế bào dòng sinusoid (nguyên bào sợi và tế bào kupffer). Sự nhuộm tụy được quan sát thấy chủ yếu ở sợi collagen và một lượng phần trăm nhỏ ở biểu mô (tế bào hạt và/hoặc tế bào ống góp). Sự nhuộm ruột kết bị hạn chế tương đối ở màng dính của biểu mô mỏng mắt và nguyên bào sợi trong niêm mạc. Phổi thể hiện sự nhuộm rất yếu và không đều trong biểu mô. BRCA84D thể hiện tính phản ứng chéo tốt ở các mô của khi đuôi dài so với profin mô người ngoại trừ việc thiếu sự nhuộm trong gan và tụy và có thể biểu hiện B7-H3 trong tế bào tuyến yên của khi đuôi dài.

Tất cả các công bố đơn và patent được đề cập trong bản mô tả này được kết hợp vào đây bằng cách viện dẫn đến cùng một phạm vi như khi từng công bố đơn hoặc đơn yêu cầu cấp patent được chỉ định một cách cụ thể và riêng biệt là được kết hợp toàn bộ bằng cách viện dẫn. Mặc dù sáng chế được mô tả cùng với các phương án cụ thể của nó, cần phải hiểu rằng có thể có các biến đổi khác và đơn này được dự định là bao gồm các thay đổi, cách sử dụng, hoặc biến đổi thích hợp bất kỳ của sáng chế theo, nhìn chung là, các nguyên tắc của sáng chế và bao gồm cả các nội dung biến đổi dựa trên bản mô tả do nằm trong thực tiễn đã biết hoặc thông thường trong lĩnh vực kỹ thuật mà sáng chế thuộc về và do có thể được áp dụng vào các đặc điểm thiết yếu nêu trên đây.

## YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Phân tử liên kết B7-H3, trong đó phân tử này là kháng thể, mảnh phản ứng miễn dịch của nó, hoặc kháng thể dạng dime, chứa miền biến đổi liên kết đặc hiệu với miền ngoại bào của B7-H3, trong đó phân tử này:

(A) liên kết với dạng đồng phân 4Ig và 2Ig của B7-H3 được biểu hiện nội sinh trên bề mặt của tế bào ung thư; và

(B) bao gồm:

(1) miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 21), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 23) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 25), và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 29), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 31) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 33); hoặc

(2) miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 5), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 9), và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 13), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17); hoặc

(3) miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 37), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 41), và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 45), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 47) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 49).

2. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết B7-H3 này chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 21), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 23) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 25), và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 29), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 31) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 33).

3. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết B7-H3 này chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 5), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 9), và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 13), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17).

4. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết B7-H3 này chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 37), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 41), và miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 45), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 47) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 49).

5. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó phân tử này được nhập vào khi liên kết với B7-H3 được biểu hiện trên bề mặt tế bào ung thư.

6. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc IgG1 biến thể của người, trong đó vùng Fc IgG1 biến thể của người này bao gồm ít nhất một biến đổi axit amin so với vùng Fc kiểu dại, (các) biến đổi axit amin này bao gồm (các) biến đổi axit amin làm thay đổi ái lực hoặc tổng ái lực của vùng Fc biến thể này để liên kết FcγR sao cho phân tử này thể hiện chức năng tác động tăng cường liên quan đến vùng Fc kiểu dại.

7. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 6, trong đó biến đổi axit amin của vùng Fc bao gồm:

(A) ít nhất một đột biến thể được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) F243L;
- (2) D270E;
- (3) R292P;
- (4) S298N;
- (5) Y300L;
- (6) V305I;
- (7) A330V; và
- (8) P396L;

(B) ít nhất một đột biến thể hai gốc axit amin, đột biến thể này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) F243L và P396L;
- (2) F243L và R292P; và
- (3) R292P và V305I;

(C) ít nhất một đột biến thể ba gốc axit amin, đột biến thể này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) F243L, R292P và Y300L;
- (2) F243L, R292P và V305I;
- (3) F243L, R292P và P396L; và
- (4) R292P, V305I và P396L;

(D) ít nhất một đột biến thể bốn gốc axit amin, đột biến thể này được chọn từ nhóm bao gồm:

- (1) F243L, R292P, Y300L và P396L; và
- (2) F243L, R292P, V305I và P396L;

hoặc

(E) đột biến thể ít nhất là năm gốc axit amin: F243L, R292P, Y300L, V305I và P396L;

trong đó việc đánh số này là theo phương pháp đánh số Kabat.

8. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 6, trong đó (các) biến đổi axit amin của vùng Fc bao gồm đột biến thể:

- (A) F243L, R292P và Y300L;
- (B) L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L; hoặc
- (C) F243L, R292P, Y300L, V305I và P396L.

trong đó việc đánh số này là theo phương pháp đánh số Kabat.

9. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 8, trong đó phân tử này bao gồm:

(A) miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 5), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 9) và miền biến đổi chuỗi nặng này bao gồm CDR<sub>1</sub> (SEQ ID

NO: 13), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17); và

(B) (các) biến đổi axit amin của vùng Fc bao gồm đột biến thể: L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L;

trong đó việc đánh số này là theo phương pháp đánh số Kabat.

10. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó kháng thể là kháng thể thể khảm.

11. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9, trong đó kháng thể là kháng thể được biến đổi giống như của người.

12. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 1, trong đó phân tử liên kết B7-H3 này bao gồm:

(A) miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 89;

(B) miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 99; và

(C) vùng Fc có đột biến thể axit amin: L235V, F243L, R292P, Y300L và P396L;

trong đó việc đánh số này là theo phương pháp đánh số Kabat.

13. Tế bào lai tiết kháng thể theo điểm 1.

14. Phân tử axit nucleic mã hoá chuỗi polypeptit của phân tử liên kết B-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12.

15. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 1, trong đó phân tử này là kháng thể dạng dime bao gồm:

(A) chuỗi polypeptit I chứa miền liên kết epitop VL globulin miễn dịch liên kết đặc hiệu với B7-H3 và miền liên kết epitop VH liên kết đặc hiệu với phân tử khác B7-H3; và

(B) chuỗi polypeptit II chứa miền liên kết epitop VH globulin miễn dịch liên kết đặc hiệu với B7-H3 và miền liên kết epitop VL liên kết đặc hiệu với phân tử khác B7-H3;

trong đó các chuỗi polypeptit I và II được kết hợp với nhau để tạo thành các miền liên kết epitop chức năng có khả năng liên kết với B7-H3 và phân tử khác B7-H3.

16. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 15, trong đó miền liên kết epitop VL liên kết

đặc hiệu với B7-H3 bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 21), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 23) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 25) và miền liên kết epitop VH liên kết đặc hiệu với B7-H3 bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 29), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 31) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 33).

17. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 15, trong đó miền liên kết epitop VL liên kết đặc hiệu với B7-H3 bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 5), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 7) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 9) và miền liên kết epitop VH liên kết đặc hiệu với B7-H3 bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 13), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 15) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 17).

18. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 15, trong đó miền liên kết epitop VL liên kết đặc hiệu với B7-H3 bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 37), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 39) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 41) và miền liên kết epitop VH liên kết đặc hiệu với B7-H3 bao gồm trình tự axit amin của CDR<sub>1</sub> (SEQ ID NO: 45), CDR<sub>2</sub> (SEQ ID NO: 47) và CDR<sub>3</sub> (SEQ ID NO: 49).

19. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 15, trong đó phân tử này bao gồm:

- (A) miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 89; và
- (B) miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự axit amin có SEQ ID NO: 99.

20. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 19, trong đó phân tử này bao gồm vùng Fc hoặc một phần của nó.

21. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 20, trong đó:

- (A) chuỗi polypeptit I cũng chứa miền cuộn E và chuỗi polypeptit II cũng chứa miền cuộn K; hoặc
- (B) chuỗi polypeptit I cũng chứa miền cuộn K và chuỗi polypeptit II cũng chứa miền cuộn E.

22. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 21, trong đó:

- (A) miền cuộn E có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 63; hoặc
- (B) miền cuộn K có trình tự axit amin có SEQ ID NO: 64.

23. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 22, trong đó phân tử khác B7-H3 là kháng nguyên không hoàn toàn.
24. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 23, trong đó kháng nguyên không hoàn toàn là isothioxyanat fluorescein.
25. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 22, trong đó phân tử khác B7-H3 là thụ thể tế bào T, đồng thụ thể tế bào T hoặc thụ thể NKG2D.
26. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 22, trong đó phân tử khác B7-H3 là kháng nguyên liên quan đến khối u.
27. Phân tử liên kết B7-H3 theo điểm 26, trong đó kháng nguyên liên quan đến khối u được chọn từ nhóm bao gồm A33; ADAM-9; ALCAM; BAGE; beta-catenin; CA125; Carboxypeptidaza M; CD103; CD19; CD20; CD22; CD23; CD25; CD27; CD28; CD36; CD40/CD154; CD45; CD46; CD5; CD56; CD79a/CD79b; CDK4; CEA; CTLA4; Cytokeratin 8; EGF-R; EphA2; ErbB1; ErbB3; ErbB4; GAGE-1; GAGE-2; GD2/GD3/GM2; gp100; HER-2/neu; papillomavirut-E6 của người; papillomavirut-E7 của người; Integrin Alpha-V-Beta-6; JAM-3; KID3; KID31; KSA (17-1A); LUCA-2; MAGE-1; MAGE-3; MART; MUC-1; MUM-1; N-axetylglucosaminyltransferaza; Oncostatin M; p15; PIPA; PSA; PSMA; ROR1; sTn; thụ thể TNF- $\beta$ ; thụ thể TNF- $\alpha$ ; thụ thể TNF- $\gamma$ ; thụ thể Transferrin; và thụ thể VEGF.
28. Phân tử axit nucleic mã hoá chuỗi polypeptit của phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 15 đến 27.
29. Dược phẩm chứa (i) lượng hữu hiệu điều trị của phân tử liên kết B7-H3 theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 12 hoặc từ 15 đến 27 và (ii) chất mang dược dụng.
30. Dược phẩm theo điểm 29, trong đó dược phẩm này cũng chứa ít nhất một chất chống ung thư bổ sung.
31. Dược phẩm theo điểm 30, trong đó chất chống ung thư bổ sung là chất hoá trị, chất xạ trị, chất trị liệu hormon, độc tố hoặc chất trị liệu miễn dịch.
32. Dược phẩm theo điểm 31, trong đó chất chống ung thư bổ sung là độc tố được chọn từ nhóm bao gồm: taxan, maytansinoit, auristatin, calicheamixin, antraxyclin, chất



tương tự CC-1065, docetaxel, cathepsin, rixin, gelonin, ngoại độc tố *Pseudomonas*, độc tố bạch hầu, ARNaza và chất đồng vị phóng xạ gây độc.

## DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> MacroGenics, Inc.  
 Loo, Deryk  
 Huang, Ling  
 <120> PHÂN TỬ LIÊN KẾT B7-H3 VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA PHÂN TỬ LIÊN KẾT B7-H3  
 NÀY  
 <130> 1301.00711  
 <150> US 61/311,057  
 <151> 2010-03-05  
 <150> US 61/310,695  
 <151> 2010-03-04  
 <150> US 61/310,692  
 <151> 2010-03-04  
 <160> 116  
 <170> Patentln version 3.5  
 <210> 1  
 <211> 316  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens  
 <400> 1

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala  
 1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gin  
 20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu  
 35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gin Leu Asn  
 50 55 60

Leu lie Trp Gin Leu Thr Asp Thr Lys Gin Leu Val His Ser Phe Ala  
 65 70 75 80

Glu Gly Gin Asp Gin Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe  
 85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gin Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gin Arg Val  
 100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser lie Arg Asp  
 115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gin Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys  
130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr  
145 150 155 160

Val Thr lie Thr Cys Ser Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val  
165 170 175

Phe Trp Gin Asp Gly Gin Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr  
180 185 190

Ser Gin Met Ala Asn Glu Gin Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu  
195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn  
210 215 220

Pro Val Leu Gin Gin Asp Ala His Gly Ser Val Thr lie Thr Gly Gin  
225 230 235 240

Pro Met Thr Phe Pro Pro Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser  
245 250 255

Val Cys Leu lie Ala Leu Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg  
260 265 270

Lys lie Lys Gin Ser Cys Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gin  
275 280 285

Asp Gly Glu Gly Glu Gly Ser Lys Thr Ala Leu Gin Pro Leu Lys His  
290 295 300

Ser Asp Ser Lys Glu Asp Asp Gly Gin Glu lie Ala  
305 310 315

<210> 2

<211> 948

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 2

atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca 60

ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggtcc ctgaagaccc agtgggtggca 120

ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg 180

```

gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct      240
gaggggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg      300
gcacagggca acgcatccct gaggctgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc      360
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccg tcagcctgca ggtggccgct      420
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg      480
gtgaccatca cgtgctccag ctaccggggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat      540
gggcagggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc      600
ttgtttgatg tgcacagcgt cctgcgggtg gtgctgggtg cgaatggcac ctacagctgc      660
ctggtgcgca accccgtgct gcagcaggat gcgcacggct ctgtcaccat cacagggcag      720
cctatgacat tccccccaga ggcctgtgg gtgaccgtgg ggctgtctgt ctgtctcatt      780
gcactgctgg tggccctggc tttcgtgtgc tggagaaaga tcaaacagag ctgtgaggag      840
gagaatgcag gagctgagga ccaggatggg gagggagaag gctccaagac agccctgcag      900
cctctgaaac actctgacag caaagaagat gatggacaag aaatagcc      948

```

<210> 3  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D

<400> 3

```

Asp lie Ala Met Thr Gin Ser Gin Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1              5              10              15

```

```

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn
20              25              30

```

```

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ser Pro Lys Ala Leu lie
35              40              45

```

```

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50              55              60

```

```

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Asn Asn Val Gin Ser
65              70              75              80

```

```

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe
85              90              95

```

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys  
100 105

<210> 4  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D

<400> 4  
gacattgcga tgaccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60  
gtcacctgca aggccagtc gaatgtggat actaatgtag cctgggtatca acagaaacca 120  
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcacccctacc ggtacagtgg agtccctgat 180  
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttcactctca ccatcaacaa tgtgcagtct 240  
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggtcgcg 300  
gggacaaagt tggaataaaa a 321

<210> 5  
<211> 11  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D CDR1

<400> 5

Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn Val Ala  
1 5 10

<210> 6  
<211> 33  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D  
CDR1

<400> 6  
aaggccagtc agaattgtgga tactaatgta gcc 33

<210> 7  
<211> 7  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D CDR2

<400> 7

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
1 5

<210> 8  
<211> 21  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D CDR2

<400> 8  
tcggcatcct accggtacag t 21

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

<220>  
<223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D CDR3

<400> 9  
Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 10  
<211> 27  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D CDR3

<400> 10  
cagcaatata acaactatcc attcacg 27

<210> 11  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi BRCA84D

<400> 11  
Asp Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin Pro Gly Gly  
1 5 10 15

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

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

Ala Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Gly Arg Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gin Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 12

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA84D

<400> 12

gatgtgcagc tgggtggagtc tgggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaaactc 60

tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120

ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat attagtagtg acagtagtgc catctactat 180

gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240

ctgcaaataa ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg 300

gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360

tcctca 366

<210> 13

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA84D CDR1

<400> 13

Phe Gly Met His

1

<210> 14  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA84D  
 CDR1

<400> 14  
 tttggaatgc ac

12

<210> 15  
 <211> 16  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA84D CDR2

<400> 15

Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
 1 5 10 15

<210> 16  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA84D  
 CDR2

<400> 16  
 tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag

48

<210> 17  
 <211> 13  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA84D CDR3

<400> 17

Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr  
 1 5 10

<210> 18  
 <211> 39



<212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA84D  
 CDR3

<400> 18  
 gggagggaaa acatttacta cggtagtagg cttgactac

39

<210> 19  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nhẹ biến đổi BRCA69D

<400> 19

Asp lie Gin Met Thr Gin Thr Thr Ser Ser Leu Ser Ala Ser Leu Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Ser Cys Arg Ala Ser Gin Asp lie Ser Asn Tyr  
 20 25 30

Leu Asn Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Asp Gly Thr Val Lys Leu Leu lie  
 35 40 45

Tyr Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Ser Leu Thr lie Asp Asn Leu Glu Gin  
 65 70 75 80

Glu Asp lie Ala Thr Tyr Phe Cys Gin Gin Gly Asn Thr Leu Pro Pro  
 85 90 95

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

<210> 20  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA69D

<400> 20  
 gatatccaga tgacacagac tacatcctcc ctgtctgcct ctctgggaga cagagtcacc

60

atcagttgca gggcaagtca ggacattagt aattatttaa actggtatca gcagaaacca

120

```

gatggaactg ttaaactcct gatctactac acatcacgat tacactcagg agtcccatca      180
aggttcagtg gcagtgggtc tggaacagat tattctctca ccattgacaa cctggagcaa      240
gaagatattg ccacttactt ttgccaacag ggtaatacgc ttcctccgac gttcggtgga      300
ggcaccaaac tggaaatcaa a                                              321

```

```

<210> 21
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA69D CDR1

```

```

<400> 21

```

```

Arg Ala Ser Gin Asp lie Ser Asn Tyr Leu Asn
1          5          10

```

```

<210> 22
<211> 33
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA69D CDR1

```

```

<400> 22
agggcaagtc aggacattag taattattta aac      33

```

```

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA69D CDR2

```

```

<400> 23

```

```

Tyr Thr Ser Arg Leu His Ser
1          5

```

```

<210> 24
<211> 21
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

```

```

<220>
<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA69D CDR2

```

```

<400> 24

```

tacacatcac gattacactc a

21

<210> 25  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA69D CDR3

<400> 25

Gin Gin Gly Asn Thr Leu Pro Pro Thr  
 1 5

<210> 26  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA69D CDR3

<400> 26  
 caacagggtatacgccttcc tccgacg

27

<210> 27  
 <211> 120  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi BRCA69D

<400> 27

Gin Val Gin Leu Gin Gin Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Ala  
 1 5 10 15

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

Trp Met Gin Trp Val Lys Gin Arg Pro Gly Gin Gly Leu Glu Trp lie  
 35 40 45

Gly Thr lie Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Arg Tyr Thr Gin Lys Phe  
 50 55 60

Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Ser Thr Ala Tyr  
 65 70 75 80

Met Gin Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys

85

90

95

Ala Arg Arg Gly lie Pro Arg Leu Trp Tyr Phe Asp Val Trp Gly Ala  
 100 105 110

Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 28  
 <211> 360  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA69D

<400> 28  
 caggttcagc tccagcagtc tggggctgag ctggcaagac ctggggcttc agtgaagttg 60  
 tcctgcaagg cttctggcta cacctttact agctactgga tgcagtgggt aaaacagagg 120  
 cctggacagg gtctggaatg gattgggact atttatcctg gagatgggtga tactaggtac 180  
 actcagaagt tcaagggcaa ggccacattg actgcagata aatcctccag cacagcctac 240  
 atgcaactca gcagcttggc atctgaggac tctgcggtct attactgtgc aagaagaggg 300  
 attccacggc tttggtactt cgatgtctgg ggcgcaggga ccacggtcac cgtctcctca 360

<210> 29  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA69D CDR1

<400> 29

Ser Tyr Trp Met Gin  
 1 5

<210> 30  
 <211> 15  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA69D  
 CDR1

<400> 30  
 agctactgga tgcag 15

<210> 31

<211> 17  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA69D CDR2

<400> 31

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Thr | lie | Tyr | Pro | Gly | Asp | Gly | Asp | Thr | Arg | Tyr | Thr | Gln | Lys | Phe | Lys |
| 1   |     |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |

Gly

<210> 32  
 <211> 51  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA69D CDR2

<400> 32  
 actatattatc ctggagatgg tgatactagg tacactcaga agttcaaggg c

51

<210> 33  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA69D CDR3

<400> 33

|     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| Arg | Gly | lie | Pro | Arg | Leu | Trp | Tyr | Phe | Asp | Val |
| 1   |     |     | 5   |     |     |     |     |     | 10  |     |

<210> 34  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA69D CDR3

<400> 34  
 agagggattc cacggctttg gtacttcgat gtc

33

<210> 35  
 <211> 108  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Trình tự axit amin của Chuỗi nhẹ biến đổi PRCA157

&lt;400&gt; 35

Asp lie Gin Met Thr Gin Ser Pro Ala Ser Leu Ser Val Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Glu Thr Val Thr lie Thr Cys Arg Ala Ser Glu Ser lie Tyr Ser Tyr  
 20 25 30

Leu Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Gin Gly Lys Ser Pro Gin Leu Leu Val  
 35 40 45

Tyr Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Gin Phe Ser Leu Lys lie Asn Ser Leu Gin Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Gly Arg Tyr Tyr Cys Gin His His Tyr Gly Thr Pro Pro  
 85 90 95

Trp Thr Phe Gly Gly Gly Thr Asn Leu Glu lie Lys  
 100 105

&lt;210&gt; 36

&lt;211&gt; 324

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi PRCA157

&lt;400&gt; 36

gacatccaga tgactcagtc tccagcctcc ctatctgtat ctgtgggaga aactgtcacc 60

attacatgtc gagcaagtga gagtatttac agttatttag catggtatca gcagaaacag 120

ggaaaatctc ctcagctcct ggtctataat acaaaaacct taccagaggg tgtgccatca 180

aggttcagtg gcagtggatc aggcacacag ttttctctga agatcaacag cctgcagcct 240

gaagattttg ggagatatta ctgtcaacat cattatggta ctctccgtg gacgttcggt 300

ggaggcacca acctggaaat caaa 324

&lt;210&gt; 37

&lt;211&gt; 11

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi PRCA157 CDR1

<400> 37

Arg Ala Ser Glu Ser lie Tyr Ser Tyr Leu Ala  
 1 5 10

<210> 38  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi PRCA157 CDR1

<400> 38  
 cgagcaagtg agagtattta cagttattta gca

33

<210> 39  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi PRCA157 CDR2

<400> 39

Asn Thr Lys Thr Leu Pro Glu  
 1 5

<210> 40  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá Chuỗi nhẹ biến đổi PRCA157 CDR2

<400> 40  
 aatacaaaaa ccttaccaga g

21

<210> 41  
 <211> 9  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi PRCA157 CDR3

<400> 41

Gln His His Tyr Gly Thr Pro Pro Trp  
 1 5

<210> 42  
 <211> 27  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi PRCA157 CDR3

<400> 42  
 caacatcatt atggtactcc tccgtgg

27

<210> 43  
 <211> 117  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi PRCA157

<400> 43

Glu Val Gin Gin Val Glu Ser Gly Gly Asp Leu Val Lys Pro Gly Gly  
 1 5 10 15

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

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

Ala Thr lie Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Leu  
 50 55 60

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

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

Ala Arg His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Ser  
 100 105 110

Val Thr Val Ser Ser  
 115

<210> 44  
 <211> 351  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo



&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi PRCA157

&lt;400&gt; 44

```

gaggtgcagc aggtggagtc ggggggagac ttagtgaagc ctggagggtc cctgaaactc      60
tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt tcctatggca tgtcttgggt tcgccagact      120
ccagacaaga ggctggagtg ggtcgcaacc attaatagtg gtggaagtaa cacctactat      180
ccagacagtt tgaaggggcg attcaccatc tccagagaca atgccaagaa caccctttac      240
ctgcaaatgc gcagtctgaa gtctgaggac acagccatgt attactgtgc aagacatgac      300
ggggggagcta tggactactg gggtaagga acctcagtca ccgtctcctc a                351

```

&lt;210&gt; 45

&lt;211&gt; 5

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Chuỗi nặng biến đổi PRCA157 CDR1

&lt;400&gt; 45

```

Ser Tyr Gly Met Ser
1                5

```

&lt;210&gt; 46

&lt;211&gt; 15

&lt;212&gt; ADN

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi PRCA157 CDR1

&lt;400&gt; 46

```

tcctatggca tgtct      15

```

&lt;210&gt; 47

&lt;211&gt; 19

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Chuỗi nặng biến đổi PRCA157 CDR2

&lt;400&gt; 47

```

Val Ala Thr lie Asn Ser Gly Gly Ser Asn Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser
1                5                10                15

```

Leu Lys Gly

<210> 48  
 <211> 57  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi PRCA157  
 CDR2

<400> 48  
 gtcgcaacca ttaatagtggtggaagtaac acctactatc cagacagttt gaagggg 57

<210> 49  
 <211> 8  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi PRCA157 CDR3

<400> 49

His Asp Gly Gly Ala Met Asp Tyr  
 1 5

<210> 50  
 <211> 24  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi PRCA157  
 CDR3

<400> 50  
 catgacgggg gagctatgga ctac 24

<210> 51  
 <211> 218  
 <212> PRT  
 <213> Homo sapiens

<400> 51

Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro  
 1 5 10 15

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met lie Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys  
 20 25 30

Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp  
 35 40 45

Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu  
50 55 60

Glu Gin Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu  
65 70 75 80

His Gin Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn  
85 90 95

Lys Ala Leu Pro Ala Pro lie Glu Lys Thr lie Ser Lys Ala Lys Gly  
100 105 110

Gin Pro Arg Glu Pro Gin Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu  
115 120 125

Met Thr Lys Asn Gin Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr  
130 135 140

Pro Ser Asp lie Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gin Pro Glu Asn  
145 150 155 160

Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe  
165 170 175

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gin Gin Gly Asn  
180 185 190

Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr  
195 200 205

Gin Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly Lys  
210 215

<210> 52

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự liên kết axit amin

<400> 52

Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly  
1 5

<210> 53

<211> 24

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit mã hoá trình tự liên kết axit amin

<400> 53

ggaggcgcat ccggaggcgg aggc

24

<210> 54

<211> 4

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin đầu tận C DART

<400> 54

Leu Gly Gly Cys

1

<210> 55

<211> 13

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền bản lề

<400> 55

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

1

5

10

<210> 56

<211> 10

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Miền bản lề

<400> 56

Glu Ser Lys Tyr Gly Pro Pro Cys Pro Ser

1

5

10

<210> 57

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin đầu tận C DART

<400> 57

Val Glu Pro Lys Ser Cys  
1 5

<210> 58  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Polynucleotit mã hoá trình tự đầu tận C DART

<400> 58  
gttgagccca aatcttgt 18

<210> 59  
<211> 10  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự chứa Xystein DART

<400> 59

Leu Gly Gly Cys Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
1 5 10

<210> 60  
<211> 30  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Polynucleotit mã hoá trình tự chứa Xystein đầu tận C DART

<400> 60  
ctgggaggct gcttcaacag gggagagtgt 30

<210> 61  
<211> 6  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự chứa Xystein DART

<400> 61

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
1 5

<210> 62  
<211> 18  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá trình tự chứa Xystein DART

<400> 62  
 ttcaacaggg gagagtgt

18

<210> 63  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự axit amin cuộn E DART

<400> 63

Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys  
 20 25

<210> 64  
 <211> 28  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự axit amin cuộn K DART

<400> 64

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val  
 1 5 10 15

Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
 20 25

<210> 65  
 <211> 5  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Thành phần liên kết

<400> 65

Gly Gly Gly Asn Ser  
 1 5

<210> 66  
 <211> 383  
 <212> PRT

&lt;213&gt; Homo sapiens

&lt;400&gt; 66

Met Gly Leu Gly Pro Val Phe Leu Leu Leu Ala Gly lie Phe Pro Phe  
 1 5 10 15

Ala Pro Pro Gly Ala Ala Ala Glu Pro His Ser Leu Arg Tyr Asn Leu  
 20 25 30

Thr Val Leu Ser Trp Asp Gly Ser Val Gin Ser Gly Phe Leu Thr Glu  
 35 40 45

Val His Leu Asp Gly Gin Pro Phe Leu Arg Cys Asp Arg Gin Lys Cys  
 50 55 60

Arg Ala Lys Pro Gin Gly Gin Trp Ala Glu Asp Val Leu Gly Asn Lys  
 65 70 75 80

Thr Trp Asp Arg Glu Thr Arg Asp Leu Thr Gly Asn Gly Lys Asp Leu  
 85 90 95

Arg Met Thr Leu Ala His lie Lys Asp Gin Lys Glu Gly Leu His Ser  
 100 105 110

Leu Gin Glu lie Arg Val Cys Glu lie His Glu Asp Asn Ser Thr Arg  
 115 120 125

Ser Ser Gin His Phe Tyr Tyr Asp Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gin Asn  
 130 135 140

Leu Glu Thr Lys Glu Trp Thr Met Pro Gin Ser Ser Arg Ala Gin Thr  
 145 150 155 160

Leu Ala Met Asn Val Arg Asn Phe Leu Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr  
 165 170 175

Lys Thr His Tyr His Ala Met His Ala Asp Cys Leu Gin Glu Leu Arg  
 180 185 190

Arg Tyr Leu Lys Ser Gly Val Val Leu Arg Arg Thr Val Pro Pro Met  
 195 200 205

Val Asn Val Thr Arg Ser Glu Ala Ser Glu Gly Asn lie Thr Val Thr  
 210 215 220

Cys Arg Ala Ser Gly Phe Tyr Pro Trp Asn lie Thr Leu Ser Trp Arg

|       |              |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
|-------|--------------|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|-----|
| 225   |              |     |     |     |     | 230 |     |     |     |     | 235 |     |     |     |     | 240 |
| Gin   | Asp          | Gly | Val | Ser | Leu | Ser | His | Asp | Thr | Gin | Gin | Trp | Gly | Asp | Val |     |
|       |              |     |     | 245 |     |     |     |     | 250 |     |     |     |     | 255 |     |     |
| Leu   | Pro          | Asp | Gly | Asn | Gly | Thr | Tyr | Gin | Thr | Trp | Val | Ala | Thr | Arg | lie |     |
|       |              |     | 260 |     |     |     |     | 265 |     |     |     |     | 270 |     |     |     |
| Cys   | Gin          | Gly | Glu | Glu | Gin | Arg | Phe | Thr | Cys | Tyr | Met | Glu | His | Ser | Gly |     |
|       |              | 275 |     |     |     |     | 280 |     |     |     |     | 285 |     |     |     |     |
| Asn   | His          | Ser | Thr | His | Pro | Val | Pro | Ser | Gly | Lys | Val | Leu | Val | Leu | Gin |     |
|       | 290          |     |     |     |     | 295 |     |     |     |     | 300 |     |     |     |     |     |
| Ser   | His          | Trp | Gin | Thr | Phe | His | Val | Ser | Ala | Val | Ala | Ala | Ala | Ala | lie |     |
| 305   |              |     |     |     | 310 |     |     |     |     | 315 |     |     |     |     | 320 |     |
| Phe   | Val          | lie | lie | lie | Phe | Tyr | Val | Arg | Cys | Cys | Lys | Lys | Lys | Thr | Ser |     |
|       |              |     |     | 325 |     |     |     |     | 330 |     |     |     |     | 335 |     |     |
| Ala   | Ala          | Glu | Gly | Pro | Glu | Leu | Val | Ser | Leu | Gin | Val | Leu | Asp | Gin | His |     |
|       |              |     | 340 |     |     |     |     | 345 |     |     |     |     | 350 |     |     |     |
| Pro   | Val          | Gly | Thr | Ser | Asp | His | Arg | Asp | Ala | Thr | Gin | Leu | Gly | Phe | Gin |     |
|       |              | 355 |     |     |     |     | 360 |     |     |     |     | 365 |     |     |     |     |
| Pro   | Leu          | Met | Ser | Asp | Leu | Gly | Ser | Thr | Gly | Ser | Thr | Glu | Gly | Ala |     |     |
|       | 370          |     |     |     |     | 375 |     |     |     |     | 380 |     |     |     |     |     |
| <210> | 67           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <211> | 305          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <212> | PRT          |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <213> | Homo sapiens |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| <400> | 67           |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |     |
| Pro   | His          | Ser | Leu | Arg | Tyr | Asn | Leu | Met | Val | Leu | Ser | Gin | Asp | Gly | Ser |     |
| 1     |              |     |     | 5   |     |     |     |     | 10  |     |     |     |     | 15  |     |     |
| Val   | Gin          | Ser | Gly | Phe | Leu | Ala | Glu | Gly | His | Leu | Asp | Gly | Gin | Pro | Phe |     |
|       |              |     | 20  |     |     |     |     | 25  |     |     |     |     | 30  |     |     |     |
| Leu   | Arg          | Tyr | Asp | Arg | Gin | Lys | Arg | Arg | Ala | Lys | Pro | Gin | Gly | Gin | Trp |     |
|       |              | 35  |     |     |     |     | 40  |     |     |     |     | 45  |     |     |     |     |
| Ala   | Glu          | Asp | Val | Leu | Gly | Ala | Lys | Thr | Trp | Asp | Thr | Glu | Thr | Glu | Asp |     |
|       | 50           |     |     |     |     | 55  |     |     |     |     | 60  |     |     |     |     |     |



Leu Thr Glu Asn Gly Gin Asp Leu Arg Arg Thr Leu Thr His lie Lys  
 65 70 75 80

Asp Gin Lys Gly Gly Leu His Ser Leu Gin Glu lie Arg Val Cys Glu  
 85 90 95

lie His Glu Asp Ser Ser Thr Arg Gly Ser Arg His Phe Tyr Tyr Asp  
 100 105 110

Gly Glu Leu Phe Leu Ser Gin Asn Leu Glu Thr Gin Glu Ser Thr Val  
 115 120 125

Pro Gin Ser Ser Arg Ala Gin Thr Leu Ala Met Asn Val Thr Asn Phe  
 130 135 140

Trp Lys Glu Asp Ala Met Lys Thr Lys Thr His Tyr Arg Ala Met Gin  
 145 150 155 160

Ala Asp Cys Leu Gin Lys Leu Gin Leu Pro Pro Met Val Asn Val lie  
 165 170 175

Cys Ser Glu Val Ser Glu Gly Asn lie Thr Val Thr Cys Arg Ala Ser  
 180 185 190

Ser Phe Tyr Pro Arg Asn lie Thr Leu Thr Trp Arg Gin Asp Gly Val  
 195 200 205

Ser Leu Ser His Asn Thr Gin Gin Trp Gly Asp Val Leu Pro Asp Gly  
 210 215 220

Asn Gly Thr Tyr Gin Thr Trp Val Ala Thr Arg lie Arg Gin Gly Glu  
 225 230 235 240

Glu Gin Arg Phe Thr Cys Tyr Met Glu His Ser Gly Asn His Gly Thr  
 245 250 255

His Pro Val Pro Ser Gly Lys Ala Leu Val Leu Gin Ser Gin Arg Thr  
 260 265 270

Asp Phe Pro Tyr Val Ser Ala Ala Met Pro Cys Phe Val lie lie lie  
 275 280 285

lie Leu Cys Val Pro Cys Cys Lys Lys Lys Thr Ser Ala Ala Glu Gly  
 290 295 300

Pro  
305

<210> 68  
<211> 107  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người

<400> 68

Asp lie Gin Leu Thr Gin Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu lie  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys  
100 105

<210> 69  
<211> 321  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Trình tự polynucleotit mã hoá Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người

<400> 69  
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60  
atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctgggtatca gcagaagcct 120  
ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180  
aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300

ggcaccaagc tggaaatcaa g

321

<210> 70  
 <211> 11  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR1

<400> 70

Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn Val Ala  
 1 5 10

<210> 71  
 <211> 33  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR1

<400> 71  
 aagccagtc agaattgtgga tactaatgta gcc

33

<210> 72  
 <211> 7  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR2

<400> 72

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser  
 1 5

<210> 73  
 <211> 21  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR2

<400> 73  
 tcggcatcct accggtacag t

21

<210> 74  
 <211> 9  
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR3

<400> 74

Gln Gln Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe Thr  
1 5

<210> 75

<211> 27

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR3

<400> 75

cagcaatata acaactatcc attcacg

27

<210> 76

<211> 534

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 76

Met Leu Arg Arg Arg Gly Ser Pro Gly Met Gly Val His Val Gly Ala  
1 5 10 15

Ala Leu Gly Ala Leu Trp Phe Cys Leu Thr Gly Ala Leu Glu Val Gln  
20 25 30

Val Pro Glu Asp Pro Val Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu  
35 40 45

Cys Cys Ser Phe Ser Pro Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gln Leu Asn  
50 55 60

Leu lie Trp Gln Leu Thr Asp Thr Lys Gln Leu Val His Ser Phe Ala  
65 70 75 80

Glu Gly Gln Asp Gln Gly Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe  
85 90 95

Pro Asp Leu Leu Ala Gln Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gln Arg Val  
100 105 110

Arg Val Ala Asp Glu Gly Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser lie Arg Asp  
115 120 125

Phe Gly Ser Ala Ala Val Ser Leu Gin Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys  
 130 135 140

Pro Ser Met Thr Leu Glu Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr  
 145 150 155 160

Val Thr lie Thr Cys Ser Ser Tyr Gin Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val  
 165 170 175

Phe Trp Gin Asp Gly Gin Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr  
 180 185 190

Ser Gin Met Ala Asn Glu Gin Gly Leu Phe Asp Val His Ser lie Leu  
 195 200 205

Arg Val Val Leu Gly Ala Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn  
 210 215 220

Pro Val Leu Gin Gin Asp Ala His Ser Ser Val Thr lie Thr Pro Gin  
 225 230 235 240

Arg Ser Pro Thr Gly Ala Val Glu Val Gin Val Pro Glu Asp Pro Val  
 245 250 255

Val Ala Leu Val Gly Thr Asp Ala Thr Leu Arg Cys Ser Phe Ser Pro  
 260 265 270

Glu Pro Gly Phe Ser Leu Ala Gin Leu Asn Leu lie Trp Gin Leu Thr  
 275 280 285

Asp Thr Lys Gin Leu Val His Ser Phe Thr Glu Gly Arg Asp Gin Gly  
 290 295 300

Ser Ala Tyr Ala Asn Arg Thr Ala Leu Phe Pro Asp Leu Leu Ala Gin  
 305 310 315 320

Gly Asn Ala Ser Leu Arg Leu Gin Arg Val Arg Val Ala Asp Glu Gly  
 325 330 335

Ser Phe Thr Cys Phe Val Ser lie Arg Asp Phe Gly Ser Ala Ala Val  
 340 345 350

Ser Leu Gin Val Ala Ala Pro Tyr Ser Lys Pro Ser Met Thr Leu Glu  
 355 360 365

Pro Asn Lys Asp Leu Arg Pro Gly Asp Thr Val Thr lie Thr Cys Ser  
370 375 380

Ser Tyr Arg Gly Tyr Pro Glu Ala Glu Val Phe Trp Gin Asp Gly Gin  
385 390 395 400

Gly Val Pro Leu Thr Gly Asn Val Thr Thr Ser Gin Met Ala Asn Glu  
405 410 415

Gin Gly Leu Phe Asp Val His Ser Val Leu Arg Val Val Leu Gly Ala  
420 425 430

Asn Gly Thr Tyr Ser Cys Leu Val Arg Asn Pro Val Leu Gin Gin Asp  
435 440 445

Ala His Gly Ser Val Thr lie Thr Gly Gin Pro Met Thr Phe Pro Pro  
450 455 460

Glu Ala Leu Trp Val Thr Val Gly Leu Ser Val Cys Leu lie Ala Leu  
465 470 475 480

Leu Val Ala Leu Ala Phe Val Cys Trp Arg Lys lie Lys Gin Ser Cys  
485 490 495

Glu Glu Glu Asn Ala Gly Ala Glu Asp Gin Asp Gly Glu Gly Glu Gly  
500 505 510

Ser Lys Thr Ala Leu Gin Pro Leu Lys His Ser Asp Ser Lys Glu Asp  
515 520 525

Asp Gly Gin Glu lie Ala  
530

<210> 77

<211> 1602

<212> ADN

<213> Homo sapiens

<400> 77

|                                                                   |     |
|-------------------------------------------------------------------|-----|
| atgctgcgtc ggcggggcag ccctggcatg ggtgtgcatg tgggtgcagc cctgggagca | 60  |
| ctgtggttct gcctcacagg agccctggag gtccaggctc ctgaagacc agtggtggca  | 120 |
| ctggtgggca ccgatgccac cctgtgctgc tccttctccc ctgagcctgg cttcagcctg | 180 |
| gcacagctca acctcatctg gcagctgaca gataccaaac agctggtgca cagctttgct | 240 |
| gagggccagg accagggcag cgcctatgcc aaccgcacgg ccctcttccc ggacctgctg | 300 |

```

gcacagggca acgcatccct gaggtgcag cgcgtgcgtg tggcggacga gggcagcttc 360
acctgcttcg tgagcatccg ggatttcggc agcgtgccg tcagcctgca ggtggccgct 420
ccctactcga agcccagcat gaccctggag cccaacaagg acctgcggcc aggggacacg 480
gtgaccatca cgtgctccag ctaccagggc taccctgagg ctgaggtgtt ctggcaggat 540
gggcaggggtg tgcccctgac tggcaacgtg accacgtcgc agatggccaa cgagcagggc 600
ttgtttgatg tgcacagcat cctgcgggtg gtgctgggtg caaatggcac ctacagctgc 660
ctggtgcgca acccctgct gcagcaggat gcgcacagct ctgtcaccat cacaccccag 720
agaagcccca caggagccgt ggaggtccag gtccctgagg acccgggtgtt ggccttagtg 780
ggcaccgatg ccacctgcg ctgtctcttc tccccgagc ctggcttcag cctggcacag 840
ctcaacctca tctggcagct gacagacacc aaacagctgg tgcacagttt caccgaaggc 900
cgggaccagg gcagcgccta tgccaaccgc acggccctct tcccggacct gctggcacia 960
ggcaatgcat ccctgaggct gcagcgcgtg cgtgtggcgg acgagggcag cttcacctgc 1020
ttcgtgagca tccgggattt cggcagcgt gccgtcagcc tgcaggtggc cgctccctac 1080
tcgaagccca gcatgaccct ggagcccaac aaggacctgc ggccagggga cacggtgacc 1140
atcacgtgct ccagctaccg gggctaccct gaggtgagg tgttctggca ggatgggcag 1200
ggtgtgcccc tgactggcaa cgtgaccacg tcgcagatgg ccaacgagca gggcttgttt 1260
gatgtgcaca gcgtcctgcg ggtggtgctg ggtgcgaatg gcacctacag ctgcctggtg 1320
cgcaaccccg tgctgcagca ggatgcgcac ggctctgtca ccatcacagg gcagcctatg 1380
acattcccc cagaggccct gtgggtgacc gtggggtgt ctgtctgtct cattgcactg 1440
ctggtggccc tggctttcgt gtgctggaga aagatcaaac agagctgtga ggaggagaat 1500
gcaggagctg aggaccagga tggggagggg gaaggctcca agacagccct gcagcctctg 1560
aaacactctg acagcaaaga agatgatgga caagaaatag cc 1602

```

<210> 78

<400> 78  
000

<210> 79

<400> 79  
000

<210> 80

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự axit amin của chuỗi nặng biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người

<400> 80

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

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

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

Ala Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

Ala Arg Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp  
100 105 110

Gly Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 81

<211> 366

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người

<400> 81

|                                                                    |     |
|--------------------------------------------------------------------|-----|
| gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg  | 60  |
| tcttgccgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct | 120 |
| ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac  | 180 |
| gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac  | 240 |
| ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg  | 300 |
| gagaatatct actacggctc ccggtggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg   | 360 |
| tcctct                                                             | 366 |



<210> 82  
 <211> 4  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR1

<400> 82

Phe Gly Met His  
 1

<210> 83  
 <211> 12  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR1

<400> 83  
 tttggaatgc ac

12

<210>  
 <211> 84  
 <212> 16  
 <213> PRT  
 Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA84D được làm giống người CDR2

<400> 84

Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys  
 1 5 10 15

<210> 85  
 <211> 48  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR2

<400> 85  
 tacattagta gtgacagtag tgccatctac tatgcagaca cagtgaag

48

<210>  
 <211> 86  
 <212> 13  
 <213> PRT  
 Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR3

<400> 86

Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr  
1 5 10

<210> 87

<211> 39

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Trình tự polynucleotit mã hoá chuỗi nặng biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người CDR3

<400> 87

gggagggaaa acatttacta cggtagtagg cttgactac

39

<210> 88

<400> 88

000

<210>

<211> 89

<212> 107

<213> PRT

Trình tự nhân tạo

<220>

<223> hBRCA84D-2VL

<400> 89

Asp lie Gin Leu Thr Gin Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu lie  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys  
100 105

<210> 90  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-2VL

<400> 90  
 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60  
 atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctgggtatca gcagaagcct 120  
 ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180  
 aggttctccg gctcoggctc tggcacccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300  
 ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 91  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> hBRCA84D-3VL

<400> 91  
 Asp lie Gin Leu Thr Gin Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15  
 Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
 20 25 30  
 Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu lie  
 35 40 45  
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly  
 50 55 60  
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro  
 65 70 75 80  
 Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
 85 90 95  
 Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys  
 100 105

<210> 92  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-3VL

<400> 92  
 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgtcc 60  
 gtcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctgggtatca gcagaagcct 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180  
 aggtttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300  
 ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 93  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> hBRCA84D-4VL

<400> 93

Asp lie Gin Leu Thr Gin Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Lys Leu Leu lie  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys  
 100 105

<210> 94  
 <211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-4VL

<400> 94  
 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60  
 atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggatatca gcagaagcct 120  
 ggccaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180  
 aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300  
 ggcaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 95  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> hBRCA84D-5VL

<400> 95

Asp lie Gin Leu Thr Gin Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ala Pro Lys Ala Leu lie  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys  
 100 105

<210> 96

<211> 321  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-5VL

<400> 96  
 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgacc 60  
 atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctgggtatca gcagaagcct 120  
 ggccaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180  
 aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240  
 gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcgggccag 300  
 ggcaccaagc tggaatatcaa g 321

<210> 97  
 <211> 107  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> hBRCA84D-6VL

<400> 97

Asp lie Gin Leu Thr Gin Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu lie  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Glu Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys  
 100 105

<210> 98  
 <211> 321

<212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-6VL

<400> 98  
 gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcca cagagtgacc 60  
 atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120  
 ggcaaggccc ctaagctgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180  
 aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcacctga ccatctccag cctgcagcct 240  
 gaggacttcg ccgagtacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300  
 ggaccaagc tggaaatcaa g 321

<210> 99  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> hBRCA84D-2VH

<400> 99

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

<210> 100  
 <211> 366  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-2VH

<400> 100  
 gaggtgcagc tggtcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60  
 tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctctccg actcctccgc catctactac 180  
 gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tccggggaca acgccaagaa ctccctgtac 240  
 ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccgtgt actactgcgg cagaggccgg 300  
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360  
 tcctct 366

<210> 101  
 <211> 122  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> hBRCA84D-3VH

<400> 101

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

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

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

Ala Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
 50 55 60

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

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

Gly Arg Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp  
 100 105 110



Gly Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
115 120

<210> 102  
<211> 366  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-3VH

<400> 102  
gaggtgcagc tggctgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60  
tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac 180  
gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240  
ctgcagatga actccctgcg ggacgaggac accgccatgt actactgcgg cagaggccgg 300  
gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360  
tcctct 366

<210> 103  
<211> 122  
<212> PRT  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> hBRCA84D-4VH

<400> 103

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

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

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

Ala Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie Tyr Tyr Ala Asp Thr Val  
50 55 60

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

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

85

90

95

Ala Arg Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp  
 100 105 110

Gly Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 115 120

<210> 104  
 <211> 366  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá hBRCA84D-4VH

<400> 104  
 gaggtgcagc tggctcgagtc tggcggagga ctggtgcagc ctggcggctc cctgagactg 60  
 tcttgcgccg cctccggctt caccttctcc agcttcggca tgcactgggt ccgccaggct 120  
 ccaggcaagg gactggaatg ggtggcctac atctcctccg actcctccgc catctactac 180  
 gccgacaccg tgaagggcag gttcaccatc tcccgggaca acgccaagaa ctccctgtac 240  
 ctgcagatga actccctgcg gagcgaggac accgccgtgt actactgcgc cagaggccgg 300  
 gagaatatct actacggctc ccggctggat tattggggcc agggcaccac cgtgaccgtg 360  
 tcctct 366

<210> 105  
 <211> 214  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nhẹ chBRCA84D

<400> 105

Asp lie Ala Met Thr Gin Ser Gin Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Gin Ser Pro Lys Ala Leu lie  
 35 40 45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly  
 50 55 60

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Asn Asn Val Gin Ser  
65 70 75 80

Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
85 90 95

Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys Arg Thr Val Ala Ala  
100 105 110

Pro Ser Val Phe lie Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gin Leu Lys Ser Gly  
115 120 125

Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala  
130 135 140

Lys Val Gin Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gin Ser Gly Asn Ser Gin  
145 150 155 160

Glu Ser Val Thr Glu Gin Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser  
165 170 175

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr  
180 185 190

Ala Cys Glu Val Thr His Gin Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser  
195 200 205

Phe Asn Arg Gly Glu Cys  
210

<210> 106  
<211> 645  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Polynucleotit mã hoá chuỗi nhẹ chBRCA84D

<400> 106  
gacattgcga tgacccagtc tcaaaaattc atgtccacat cagtaggaga cagggtcagc 60  
gtcacctgca aggccagtc gaattgtggat actaatgtag cctgggtatca acagaaacca 120  
gggcaatctc ctaaagcact gatttactcg gcatcctacc ggtacagtgg agtcacctgat 180  
cgcttcacag gcagtggatc tgggacagat ttactctca ccatcaacaa tgtgcagtc 240  
gaagacttgg cagagtattt ctgtcagcaa tataacaact atccattcac gttcggctcg 300  
gggacaaagt tggaaataaa acgtacggtg gctgcacat ctgtcttcat cttcccgcca 360

```

tctgatgagc agttgaaatc tggaactgcc tctgttgtgt gcctgctgaa taacttctat      420
cccagagagg ccaaagtaca gtggaaggtg gataacgccc tccaatcggg taactcccag      480
gagagtgtca cagagcagga cagcaaggac agcacctaca gcctcagcag caccctgacg      540
ctgagcaaag cagactacga gaaacacaaa gtctacgcct gcgaagtcac ccatcagggc      600
ctgagctcgc ccgtcacaaa gagcttcaac aggggagagt gttag                        645

```

<210> 107  
 <211> 452  
 <212> PRT  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Chuỗi nặng chBRCA84D

<400> 107

```

Asp Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin Pro Gly Gly
1              5              10              15

```

```

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

```

```

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

```

```

Ala Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie Tyr Tyr Ala Asp Thr Val
50              55              60

```

```

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

```

```

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

```

```

Gly Arg Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp Tyr Trp
100              105              110

```

```

Gly Gin Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro
115              120              125

```

```

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

```

```

Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
145              150              155              160

```

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

|                                                                 |     |     |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|
| 405                                                             | 410 | 415 |
| Val Asp Lys Ser Arg Trp Gin Gin Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val |     |     |
| 420                                                             | 425 | 430 |
| Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gin Lys Ser Leu Ser Leu |     |     |
| 435                                                             | 440 | 445 |
| Ser Pro Gly Lys                                                 |     |     |
| 450                                                             |     |     |

<210> 108  
 <211> 1359  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá chuỗi nặng chBRCA84D

<400> 108  
 gatgtgcagc tgggtggagtc tggggggaggc ttagtgcagc ctggagggtc ccggaactc 60  
 tcctgtgcag cctctggatt cactttcagt agctttggaa tgcactgggt tcgtcaggct 120  
 ccagagaagg ggctggagtg ggtcgcatat attagtagtg acagtagtgc catctactat 180  
 gcagacacag tgaagggccg attcaccatc tccagagaca atcccaagaa caccctgttc 240  
 ctgcaaatga ccagtctaag gtctgaggac acggccatgt attactgtgg aagagggagg 300  
 gaaaacattt actacggtag taggcttgac tactggggcc aaggcaccac tctcacagtc 360  
 tcctcagcct ccaccaaggg cccatcggtc ttccccctgg caccctcttc caagagcacc 420  
 tctgggggca cagcggccct gggctgcctg gtcaaggact acttccccga accggtgacg 480  
 gtgtcgtgga actcaggcgc cctgaccagc ggcgtgcaca ccttcccggc tgtcctacag 540  
 tcctcaggac tctactccct cagcagcgtg gtgaccgtgc cctccagcag cttgggcacc 600  
 cagacctaca tctgcaacgt gaatcacaag cccagcaaca ccaagggtgga caagagagtt 660  
 gagcccaaat cttgtgacaa aactcacaca tgcccaccgt gcccagcacc tgaactcctg 720  
 gggggaccgt cagtcttcct cttcccccca aaaccgaagg acaccctcat gatctcccg 780  
 acccctgagg tcacatgcgt ggtggtggac gtgagccacg aagaccctga ggtcaagttc 840  
 aactggtacg tggacggcgt ggaggtgcat aatgccaaga caaagccgcg ggaggagcag 900  
 tacaacagca cgtaccgtgt ggtcagcgtc ctcaccgtcc tgcaccagga ctggctgaat 960  
 ggcaaggagt acaagtgcaa ggtctccaac aaagccctcc cagcccccat cgagaaaacc 1020  
 atctccaaag ccaagggga gccccgagaa ccacaggtgt acaccctgcc cccatcccg 1080  
 gatgagctga ccaagaacca ggtcagcctg acctgcctgg tcaaaggctt ctatccagc 1140

gacatcgccg tggagtggga gagcaatggg cagccggaga acaactacaa gaccacgcct 1200  
 cccgtgctgg actccgacgg ctcttcttc ctctacagca agctcacctg ggacaagagc 1260  
 aggtggcagc aggggaacgt cttctcatgc tccgtgatgc atgaggctct gcacaaccac 1320  
 tacacgcaga agagcctctc cctgtctccg ggtaaata 1359

<210> 109

<211> 270

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi TCR VL x hBRCA84D VH-2-cuộn E DART

<400> 109

Glu lie Val Leu Thr Gin Ser Pro Ala Thr Leu Ser Leu Ser Pro Gly  
 1 5 10 15

Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Ser Ala Thr Ser Ser Val Ser Tyr Met  
 20 25 30

His Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Arg Trp lie Tyr  
 35 40 45

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

Gly Ser Gly Thr Glu Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro Glu  
 65 70 75 80

Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Trp Ser Ser Asn Pro Leu Thr  
 85 90 95

Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys Gly Gly Gly Ser Gly Gly  
 100 105 110

Gly Gly Glu Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gin Pro  
 115 120 125

Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser  
 130 135 140

Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu  
 145 150 155 160

Trp Val Ala Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie Tyr Tyr Ala Asp

|                                                                 |     |     |     |  |     |  |
|-----------------------------------------------------------------|-----|-----|-----|--|-----|--|
|                                                                 | 165 |     | 170 |  | 175 |  |
| Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Ser | 180 | 185 | 190 |  |     |  |
| Leu Tyr Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp Thr Ala Val Tyr | 195 | 200 | 205 |  |     |  |
| Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly Ser Arg Leu Asp | 210 | 215 | 220 |  |     |  |
| Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly | 225 | 230 | 235 |  | 240 |  |
| Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys | 245 | 250 | 255 |  |     |  |
| Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys         | 260 | 265 | 270 |  |     |  |

<210> 110  
 <211> 810  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá chuỗi TCR VL x hBRCA84D VH-2-cuộn E DART

<400> 110  
 gaaattgtgt tgacacagtc tccagccacc ctgtctttgt ctccagggga aagagccacc 60  
 ctctcctgca gtgccacctc aagtgttaagt tacatgcact ggtatcagca gaaaccaggg 120  
 aaagccccta agcgctggat ctatgacaca tccaaactgg cttctggggg cccatcaagg 180  
 ttcagcggca gtggatctgg gacagaattt actctcaca tcagcagcct gcagcctgaa 240  
 gatttttcaa cttattactg tcagcagtgg agtagtaacc cgctcacgtt tggccagggg 300  
 accaagcttg agatcaaagg aggcggatcc ggcggcggag gcgaggtgca gctggtcgag 360  
 tctggcggag gactggtgca gcctggcggc tcctgagac tgtcttgccg cgctccggc 420  
 ttcaccttct ccagcttcgg catgcactgg gtccgccagg ctccaggcaa gggactggaa 480  
 tgggtggcct acatctcctc cgactcctcc gccatctact acgccgacac cgtgaagggc 540  
 aggttcacca tctcccgga caacgccaa aactccctgt acctgcagat gaactccctg 600  
 cgggacgagg acaccgccgt gtactactgc ggcagaggcc gggagaatat ctactacggc 660  
 tcccggctgg attattgggg ccagggcacc accgtgaccg tgcctccgg aggatgtggc 720  
 ggtggagaag tggccgcact ggagaaagag gttgctgctt tggagaagga ggtcgctgca 780



cttgaaaagg aggtcgagc cctggagaaa

810

&lt;210&gt; 111

&lt;211&gt; 269

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Chuỗi hBRCA84DVL-2 x TCR VH cuộn K

&lt;400&gt; 111

Asp lie Gin Leu Thr Gin Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
 1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
 20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu lie  
 35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro  
 65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
 85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
 100 105 110

Gly Gly Gly Gin Val Gin Leu Val Gin Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys  
 115 120 125

Pro Gly Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Lys Phe  
 130 135 140

Thr Ser Tyr Val Met His Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Gin Gly Leu  
 145 150 155 160

Glu Trp lie Gly Tyr lie Asn Pro Tyr Asn Asp Val Thr Lys Tyr Asn  
 165 170 175

Glu Lys Phe Lys Gly Arg Val Thr lie Thr Ala Asp Lys Ser Thr Ser  
 180 185 190

Thr Ala Tyr Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val  
195 200 205

His Tyr Cys Ala Arg Gly Ser Tyr Tyr Asp Tyr Asp Gly Phe Val Tyr  
210 215 220

Trp Gly Gin Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly Gly  
225 230 235 240

Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys  
245 250 255

Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
260 265

<210> 112  
<211> 807  
<212> ADN  
<213> Trình tự nhân tạo

<220>  
<223> Polynucleotit mã hoá chuỗi hBRCA84DVL-2 x TCR VH cuộn K

<400> 112  
gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc 60  
atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctggtatca gcagaagcct 120  
ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc 180  
aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct 240  
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag 300  
ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcggcg gaggccaggt tcagctggtg 360  
cagtctggag ctgaggtgaa gaagcctggg gcctcagtga aggtctcctg caaggccagc 420  
ggttacaagt ttaccagcta cgtgatgcac tgggtgcgac agggccctgg acaagggctt 480  
gagtggatcg gatataatga tccttacaat gatgttacta agtacaatga gaagttcaaa 540  
ggcagagtca cgattaccgc ggacaaatcc acgagcacag cctacctgca gatgaacagc 600  
ctgagatccg aggacacggc cgtgcactac tgtgcgagag ggagctacta tgattacgac 660  
gggtttgttt actggggcca agggactctg gtcactgtga gctccggagg atgtggcggt 720  
ggaaaagtgg ccgcactgaa ggagaaagtt gctgctttga aagagaaggt cgccgcactt 780  
aagggaaaagg tcgcagccct gaaagag 807

<210> 113  
<211> 274

&lt;212&gt; PRT

&lt;213&gt; Trình tự nhân tạo

&lt;220&gt;

&lt;223&gt; Chuỗi NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-cuộn E DART

&lt;400&gt; 113

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

Ser lie Thr lie Ser Cys Ser Gly Ser Ser Ser Asn lie Gly Asn Asn  
 20 25 30

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

lie Tyr Tyr Asp Asp Leu Leu Pro Ser Gly Val Ser Asp Arg Phe Ser  
 50 55 60

Gly Ser Lys Ser Gly Thr Ser Ala Phe Leu Ala lie Ser Gly Leu Gln  
 65 70 75 80

Ser Glu Asp Glu Ala Asp Tyr Tyr Cys Ala Ala Trp Asp Asp Ser Leu  
 85 90 95

Asn Gly Pro Val Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Thr Val Leu Gly Gly  
 100 105 110

Gly Ser Gly Gly Gly Gly Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly  
 115 120 125

Leu Val Gln Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly  
 130 135 140

Phe Thr Phe Ser Ser Phe Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly  
 145 150 155 160

Lys Gly Leu Glu Trp Val Ala Tyr lie Ser Ser Asp Ser Ser Ala lie  
 165 170 175

Tyr Tyr Ala Asp Thr Val Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn  
 180 185 190

Ala Lys Asn Ser Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Asp Glu Asp  
 195 200 205

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Gly Arg Gly Arg Glu Asn lie Tyr Tyr Gly

210                                      215                                      220  
 Ser Arg Leu Asp Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser  
 225                                      230                                      235                                      240  
  
 Gly Gly Cys Gly Gly Gly Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala  
                                     245                                      250                                      255  
  
 Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu Glu Lys Glu Val Ala Ala Leu  
                                     260                                      265                                      270

Glu Lys

<210> 114  
 <211> 822  
 <212> ADN  
 <213> Trình tự nhân tạo  
  
 <220>  
 <223> Polynucleotit mã hoá chuỗi NKG2D VL x hBRCA84D VH-2-cuộn E DART

<400> 114  
 cagtctgccc tgactcagcc tgccctccgtg tctgggtctc ctggacagtc aatcaccatc 60  
 tcctgttctg gaagcagctc caacatcgga aataatgctg ttaactggta ccagcagctc 120  
 ccaggaaagg ctcccaaact cctcatctat tatgatgacc tactgccctc aggggtctct 180  
 gaccgattct ctggctccaa gtctggcacc tcagccttcc tggccatcag tgggctccag 240  
 tctgaggatg aggctgatta ttactgtgca gcatgggatg acagcctgaa tgggtccagt 300  
 ttcggcggag ggaccaagct gaccgtccta ggaggcggat ccggcggcgg aggcgaggtg 360  
 cagctggctg agtctggcgg aggactgggtg cagcctggcg gctccctgag actgtcttgc 420  
 gccgcctccg gcttcacott ctccagcttc ggcatgcact gggtcgcga ggctccaggc 480  
 aagggactgg aatgggtggc ctacatctcc tccgactcct ccgccatcta ctacgccgac 540  
 accgtgaagg gcaggttcac catctcccgg gacaacgcca agaactccct gtacctgcag 600  
 atgaactccc tgcgggacga ggacaccgcc gtgtactact gcggcagagg ccggggagaat 660  
 atctactacg gctcccggct ggattattgg ggccagggca ccaccgtgac cgtgtcctcc 720  
 ggaggatgtg gcggtggaga agtggcgcga ctggagaaaag aggttgctgc tttggagaag 780  
 gaggtcgtg cacttgaaaa ggaggtcgca gccctggaga aa 822

<210> 115  
 <211> 270  
 <212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Chuỗi hBRCA84DVL-2 x NKG2D VH cuộn K

<400> 115

Asp lie Gin Leu Thr Gin Ser Pro Ser Phe Leu Ser Ala Ser Val Gly  
1 5 10 15

Asp Arg Val Thr lie Thr Cys Lys Ala Ser Gin Asn Val Asp Thr Asn  
20 25 30

Val Ala Trp Tyr Gin Gin Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Ala Leu lie  
35 40 45

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr lie Ser Ser Leu Gin Pro  
65 70 75 80

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gin Gin Tyr Asn Asn Tyr Pro Phe  
85 90 95

Thr Phe Gly Gin Gly Thr Lys Leu Glu lie Lys Gly Gly Gly Ser Gly  
100 105 110

Gly Gly Gly Gin Val Gin Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys  
115 120 125

Pro Gly Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe  
130 135 140

Ser Ser Tyr Gly Met His Trp Val Arg Gin Ala Pro Gly Lys Gly Leu  
145 150 155 160

Glu Trp Val Ala Phe lie Arg Tyr Asp Gly Ser Asn Lys Tyr Tyr Ala  
165 170 175

Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr lie Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn  
180 185 190

Thr Leu Tyr Leu Gin Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val  
195 200 205

Tyr Tyr Cys Ala Lys Asp Arg Gly Leu Gly Asp Gly Thr Tyr Phe Asp  
210 215 220

Tyr Trp Gly Gin Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser Gly Gly Cys Gly  
225 230 235 240

Gly Gly Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
245 250 255

Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu Lys Val Ala Ala Leu Lys Glu  
260 265 270

<210> 116

<211> 810

<212> ADN

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Polynucleotit mã hoá chuỗi hBRCA84DVL-2 x NKG2D VH cuộn K

<400> 116

```

gacatccagc tgacccagtc cccctccttc ctgtctgcct ccgtgggcga cagagtgacc      60
atcacatgca aggcctccca gaacgtggac accaacgtgg cctgggtatca gcagaagcct      120
ggcaaggccc ctaaggcgct gatctactcc gcctcctacc ggtactccgg cgtgccttcc      180
aggttctccg gctccggctc tggcaccgac ttcaccctga ccatctccag cctgcagcct      240
gaggacttcg ccacctacta ctgccagcag tacaacaact accctttcac cttcggccag      300
ggcaccaagc tggaaatcaa gggaggcgga tccggcgggc gagggccaggt acagctgggt      360
gagtctgggg gaggcctggc caagcctgga gggtcctga gactctcctg tgcagcgtct      420
ggattcacct tcagtagcta tggcatgcac tgggtccgcc aggtccagg caaggggctg      480
gagtgggtgg catttatacg gtatgatgga agtaataaat actatgcaga ctccgtgaag      540
ggccgattca ccatctccag agacaattcc aagaacacgc tgtatctgca aatgaacagc      600
ctgagagctg aggacacggc tgtgtattac tgtgcgaaag atcgaggttt gggggatgga      660
acctactttg actactgggg ccaagggacc acggtcaccg tctcctccgg aggatgtggc      720
ggtggaaaag tggccgcact gaaggagaaa gttgctgctt tgaaagagaa ggtcgccgca      780
cttaaggaaa aggtcgcagc cctgaaagag      810

```

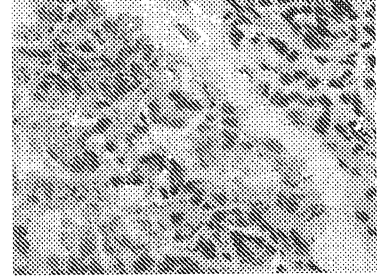
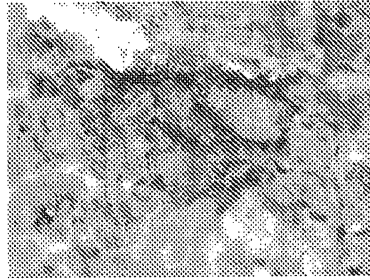
1/36

**Loại mô  
thường**

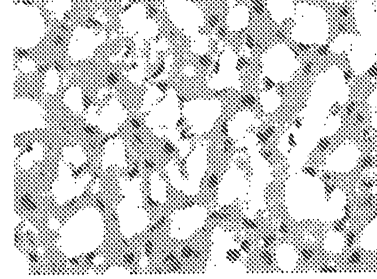
**BRCA84D  
0,625 µg/ml**

**BRCA84D  
0,078 µg/ml**

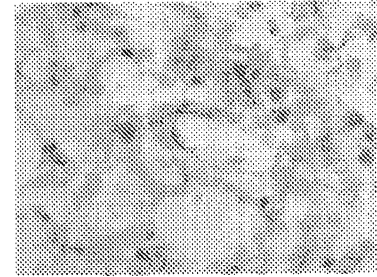
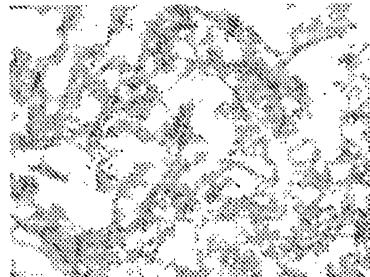
**Tụy**



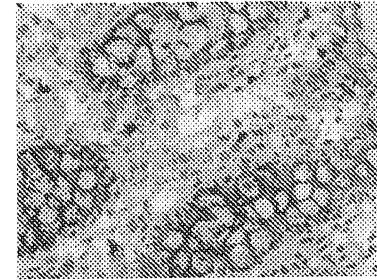
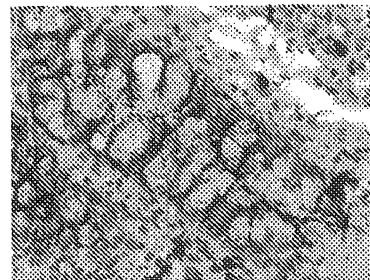
**Gan**



**Phổi**



**Ruột kết**



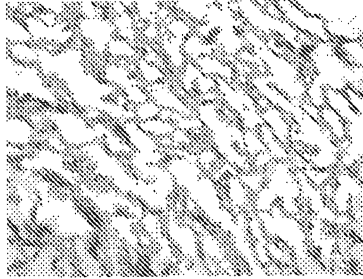
**Fig. 1A**

2/36

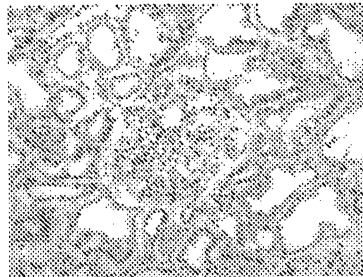
**Loại mô  
thường**

**BRCA84D  
0,625 µg/ml**

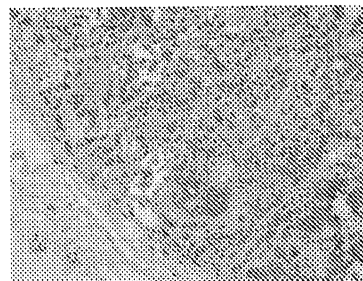
**Tim**



**Thận**



**Tuyến  
thượng thận**



**Fig. 1B**



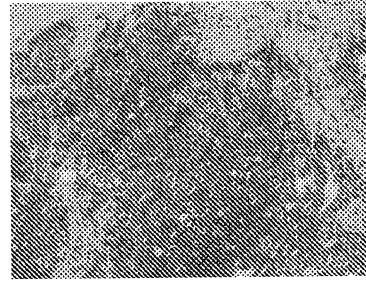
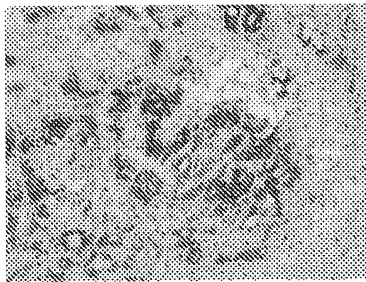
3/36

**Loại mô ung  
thư**

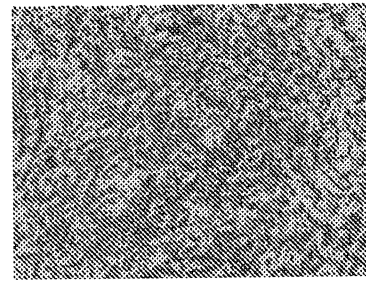
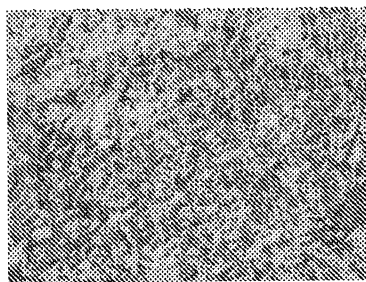
**BRCA84D  
0,625 µg/ml**

**BRCA84D  
0,078 µg/ml**

**Tuyến tiền  
liệt**



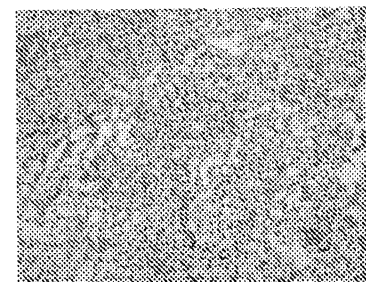
**Vú**



**Ruột kết**



**Phổi**



**Fig. 2**

4/36

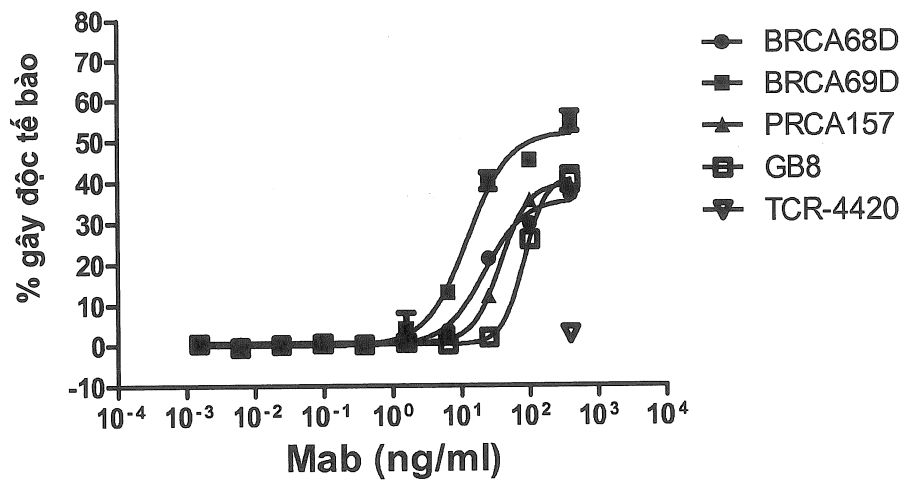


Fig. 3A

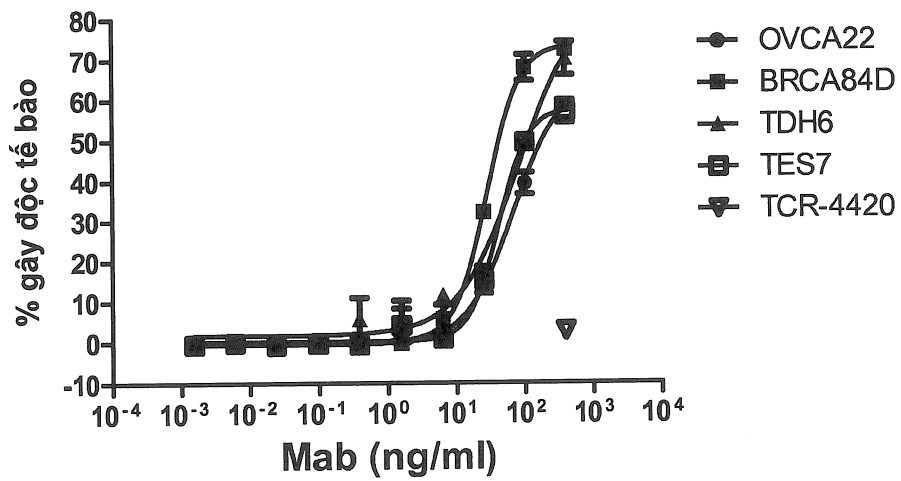


Fig. 3B

5/36

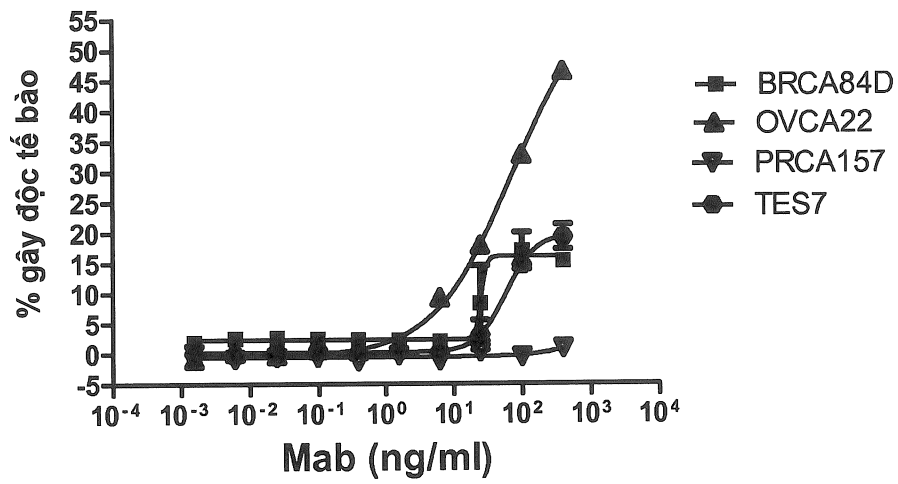


Fig. 3C

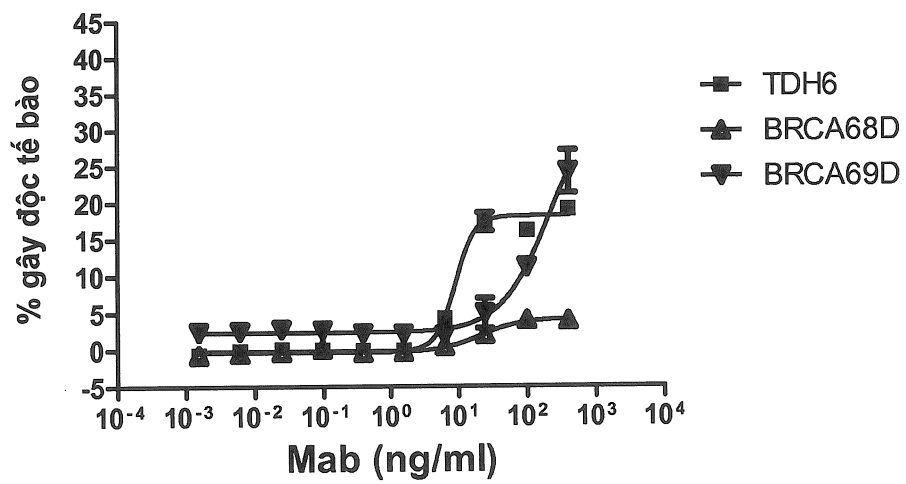


Fig. 3D

6/36

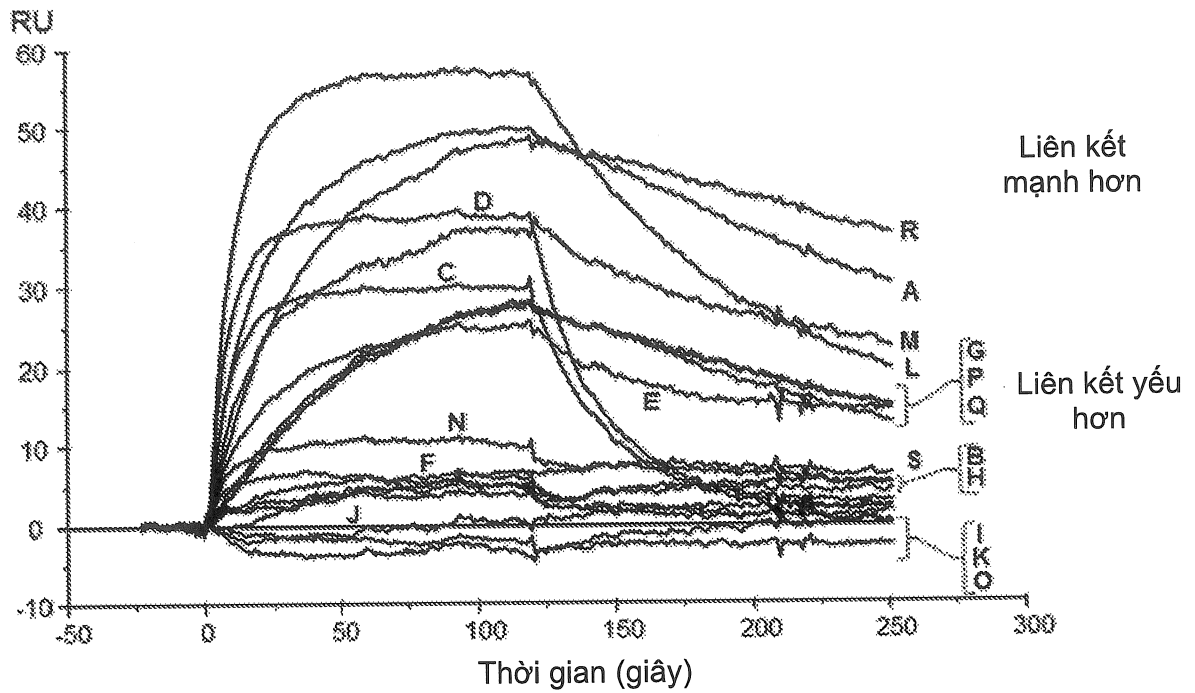


Fig. 4A

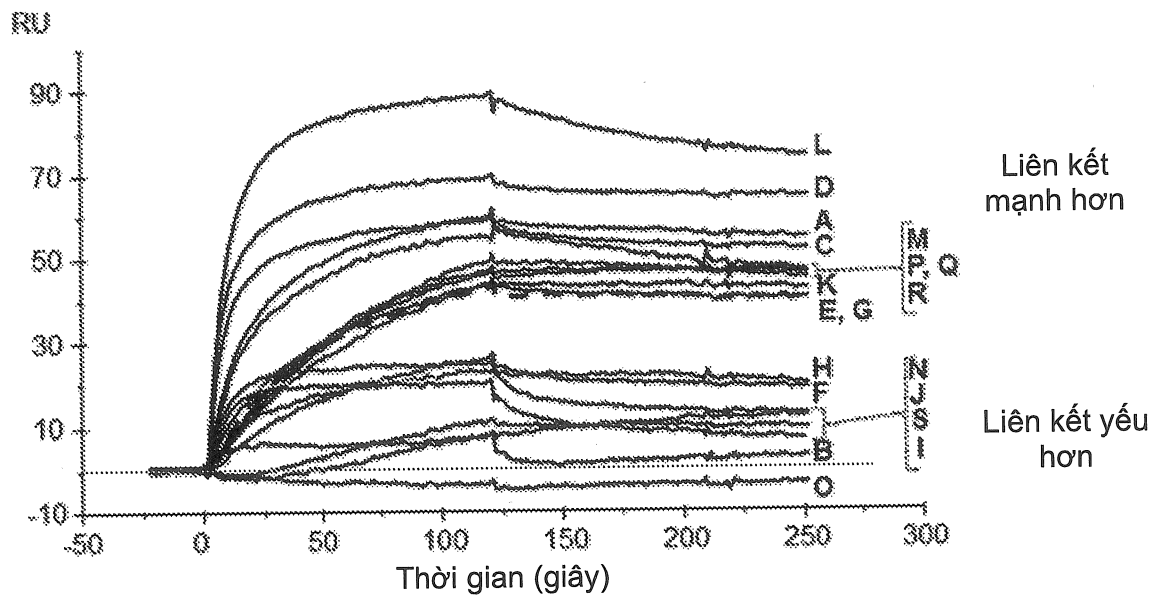


Fig. 4B

7/36

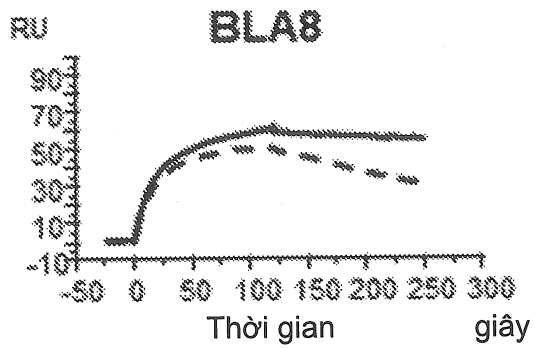


Fig. 5A

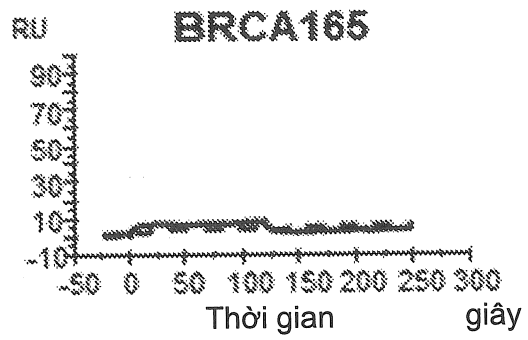


Fig. 5B

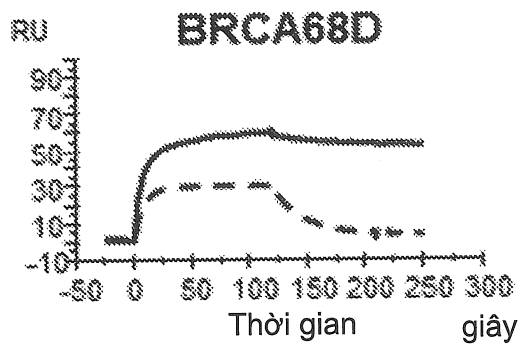


Fig. 5C

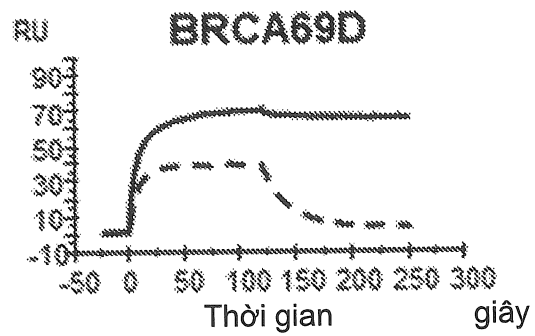


Fig. 5D

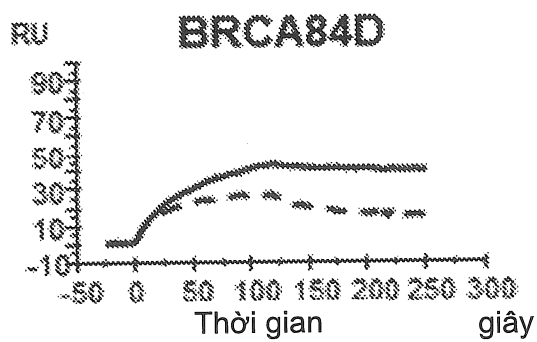


Fig. 5E

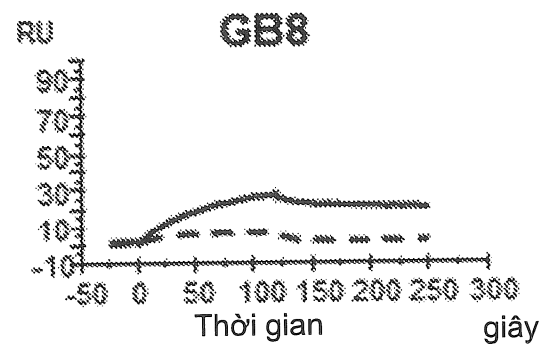


Fig. 5F

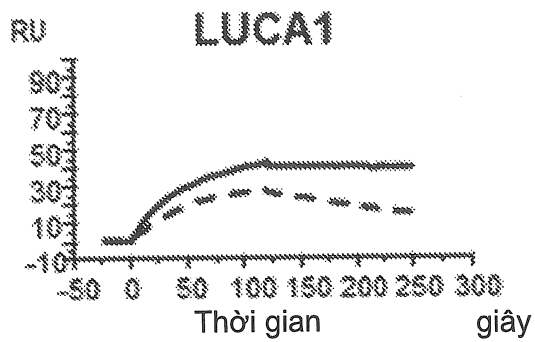


Fig. 5G

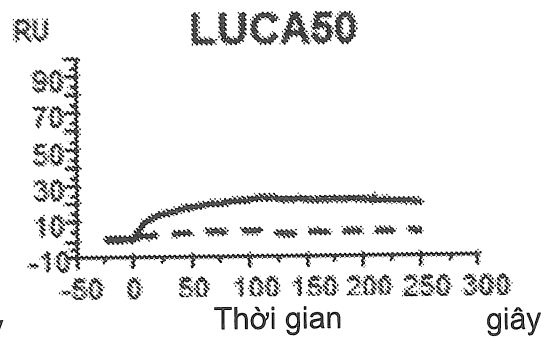


Fig. 5H

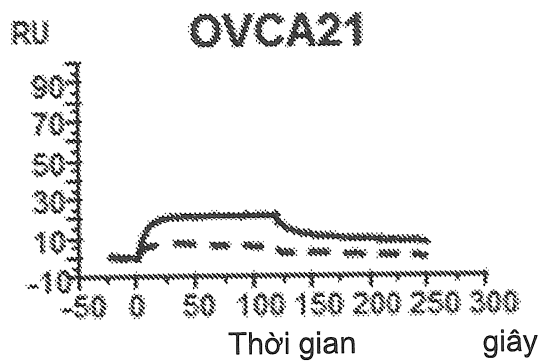


Fig. 5I

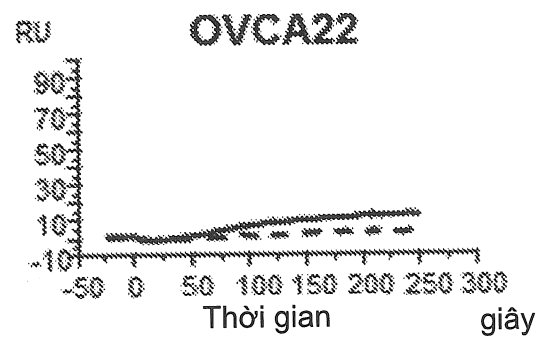


Fig. 5J

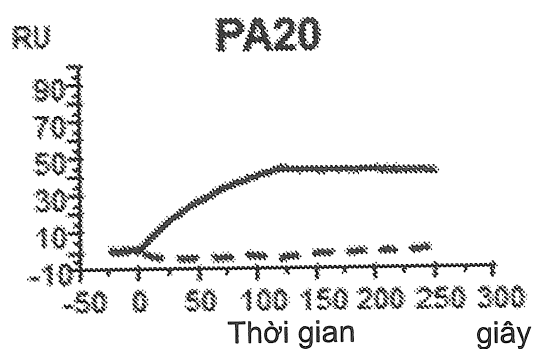


Fig. 5K

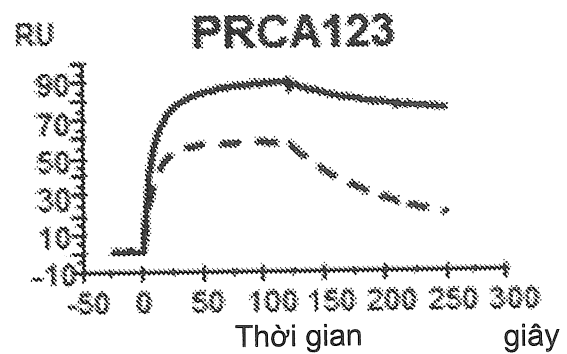


Fig. 5L

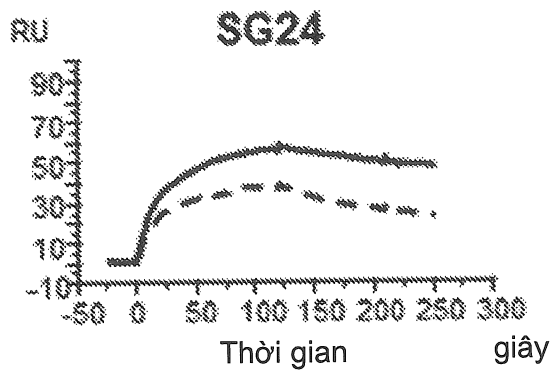


Fig. 5M

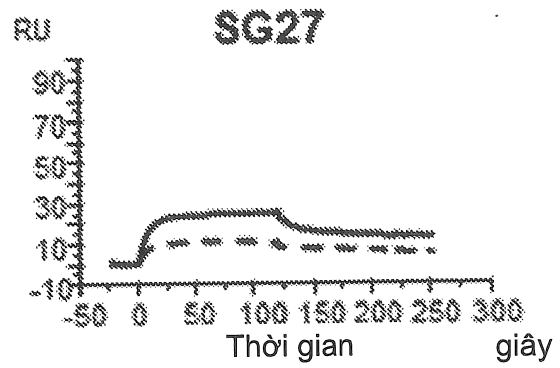


Fig. 5N

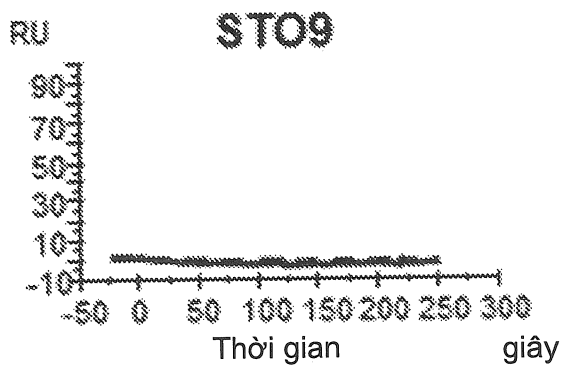


Fig. 5O

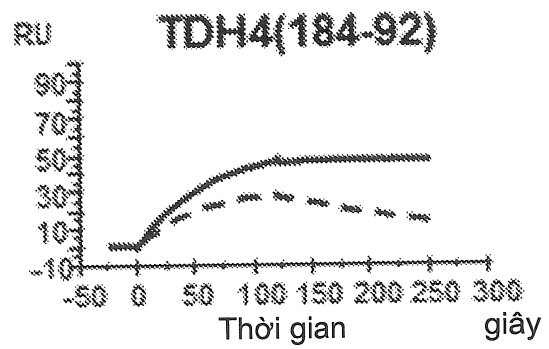


Fig. 5P

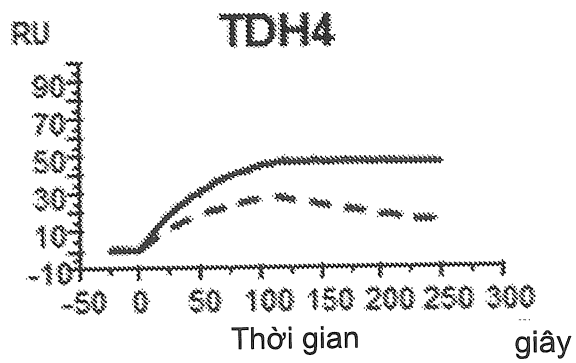


Fig. 5Q

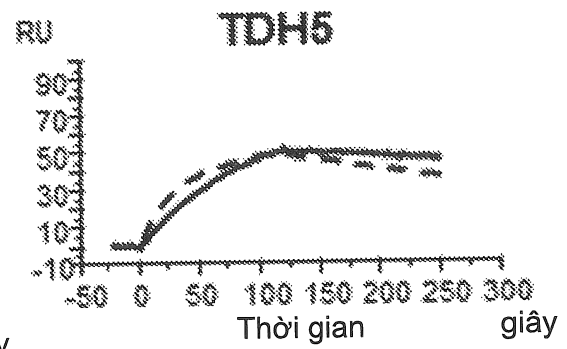


Fig. 5R

10/36

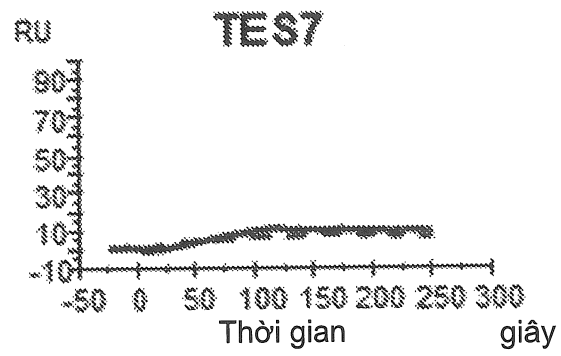


Fig. 5S

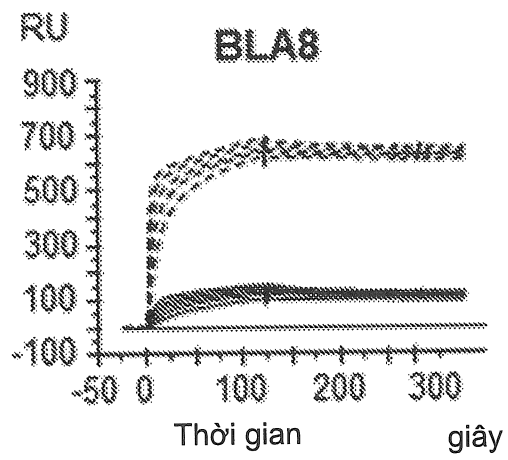


Fig. 6A

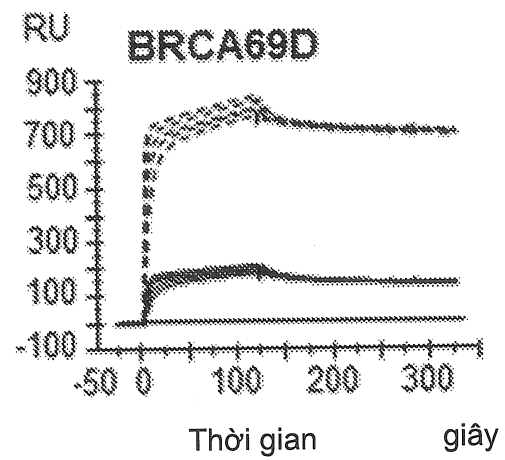


Fig. 6B



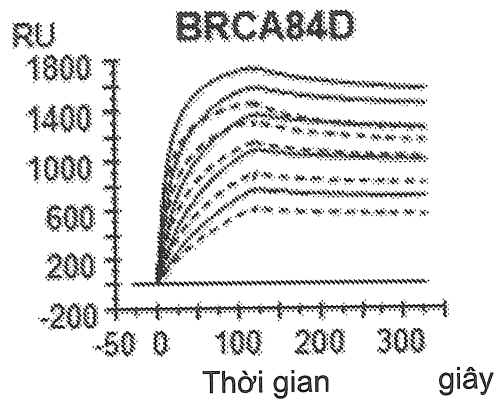


Fig. 6C

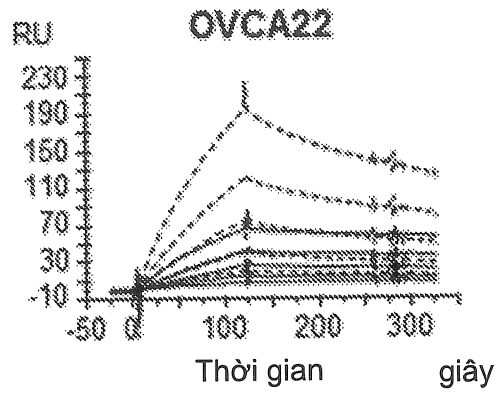


Fig. 6D

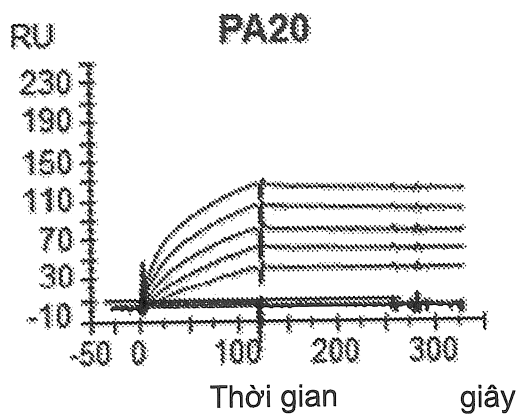


Fig. 6E

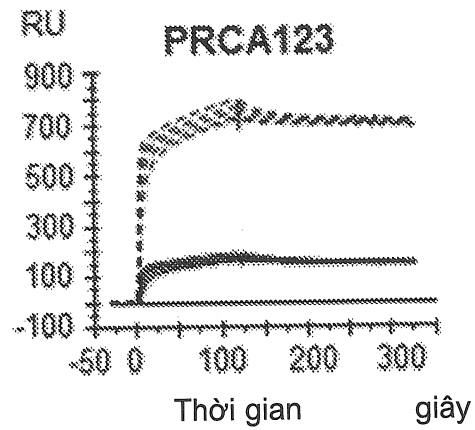


Fig. 6F

12/36

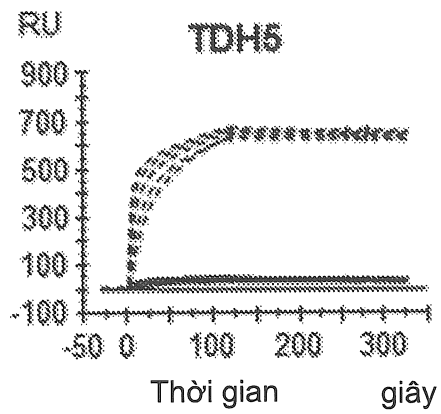


Fig. 6G

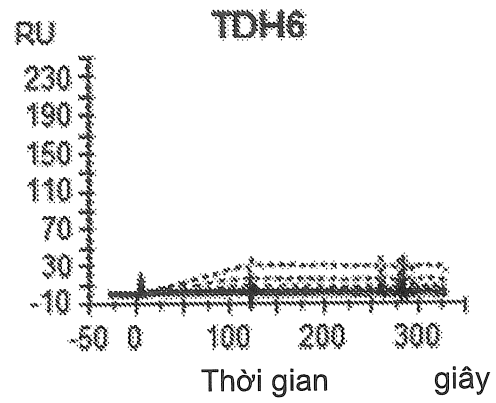


Fig. 6H

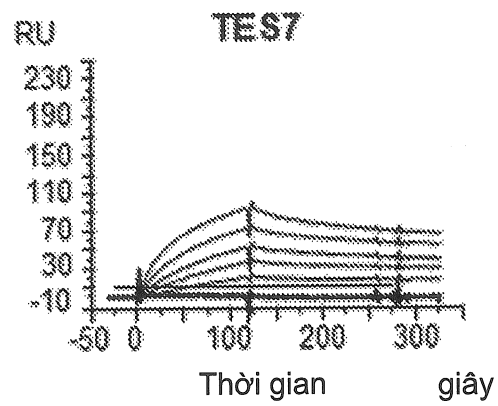


Fig. 6I

13/36

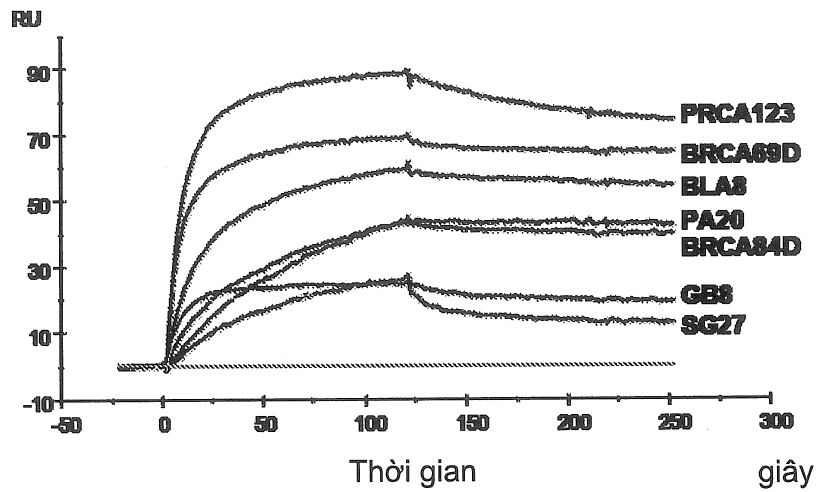


Fig. 7

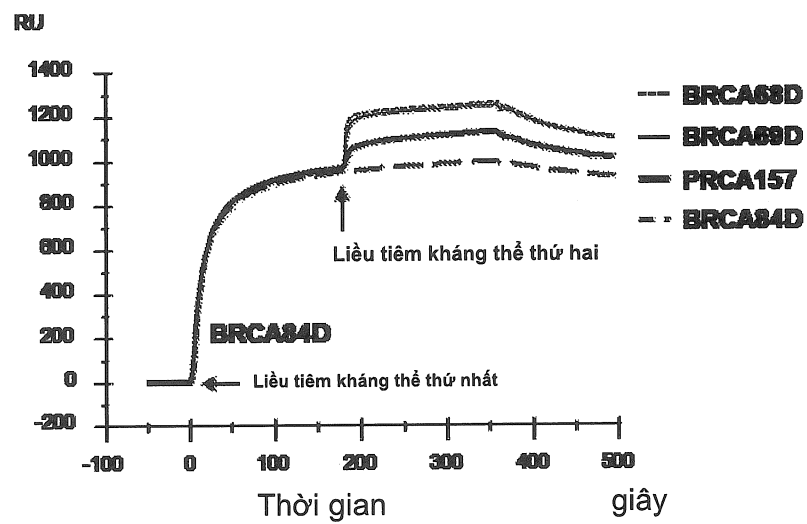


Fig. 8

## CSC tuyến tiền liệt

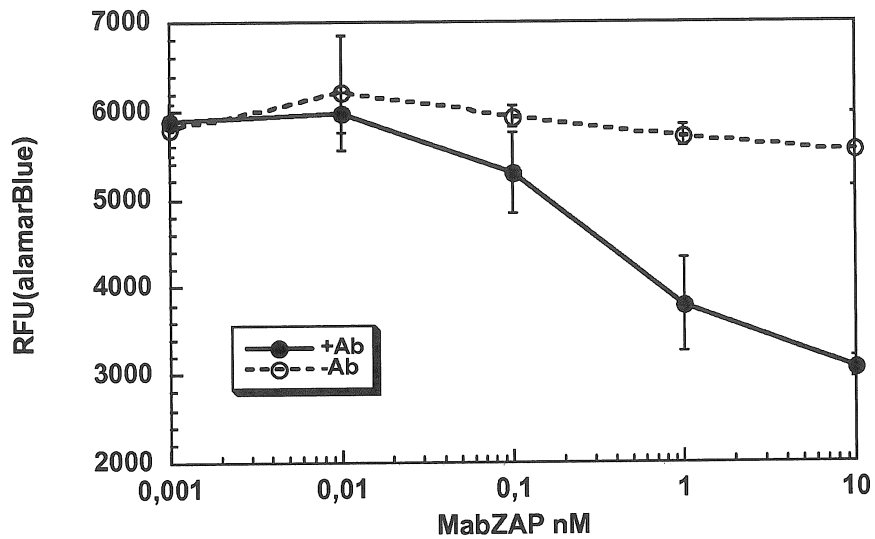


Fig. 9A

## Ung thư tụy Hs700t

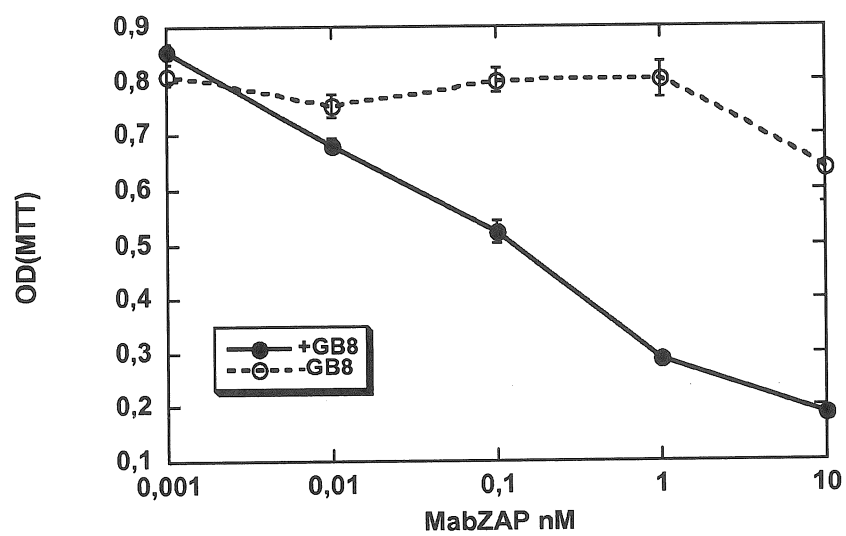


Fig. 9B

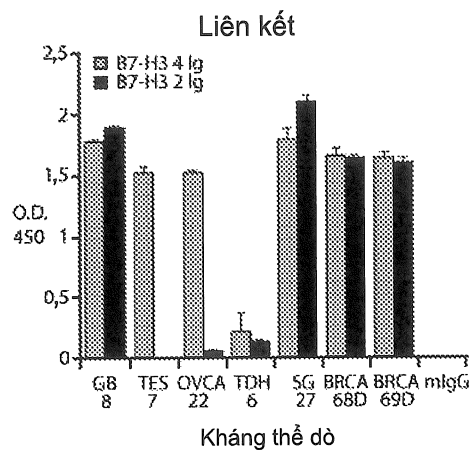


Fig. 10A

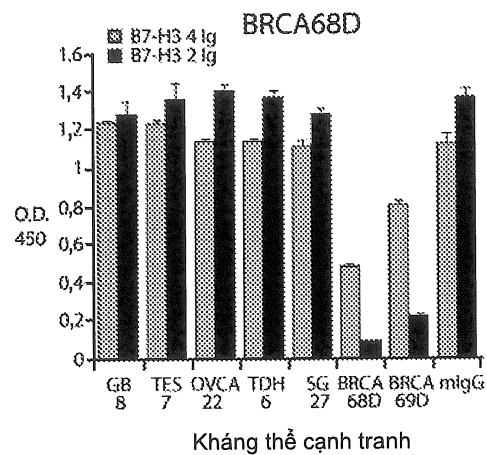


Fig. 10B

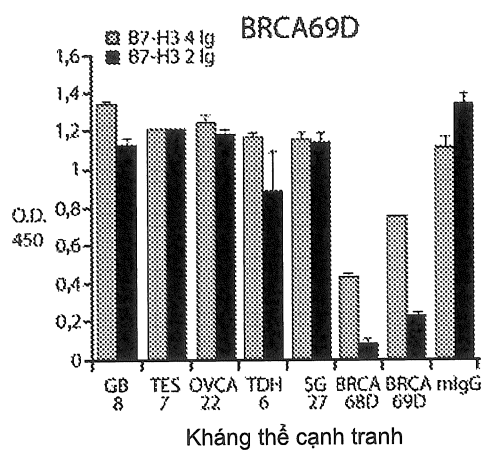


Fig. 10C

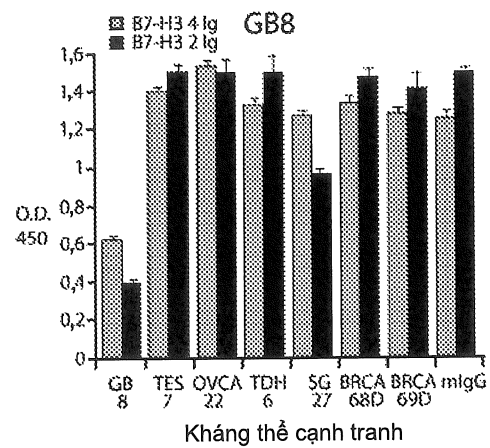


Fig. 10D

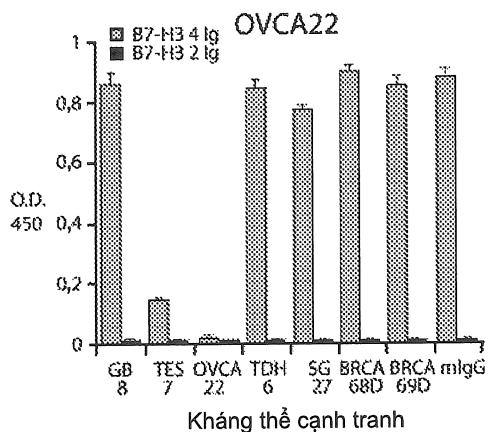


Fig. 10E

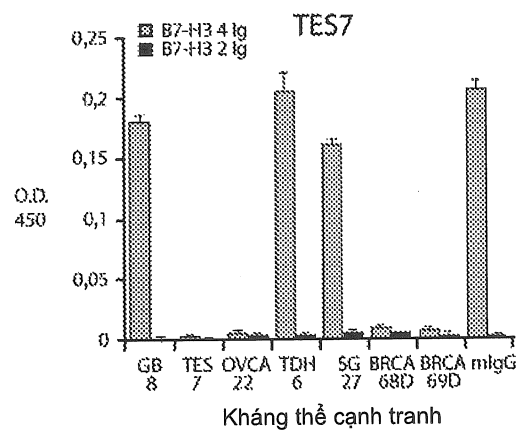


Fig. 10F

16/36

|     |            |            |                  |            |            |
|-----|------------|------------|------------------|------------|------------|
|     | 10         | 20         | 30               | 40         | 50         |
| (1) | DIAMTQSQKF | MSTSVGDRVS | VTCKASQNV        | TNVAWYQOKP | GQSPKALIYS |
| (2) | DIQLTQSPSF | LSASVGDRVT | <u>ITCKASQNV</u> | TNVAWYQOKP | GKAPKLLIYS |

|     |                   |            |            |            |                   |
|-----|-------------------|------------|------------|------------|-------------------|
|     | 60                | 70         | 80         | 90         | 100               |
| (1) | ASYRYSGVFD        | RFTGSGSGTD | FTLTINNVQS | EDLAEYFCQQ | YNNYPFTFGS        |
| (2) | <u>ASYRYSGVPS</u> | RFSGSGSGTD | FTLTISSLQP | EDFATYTCQQ | <u>YNNYPFTFGQ</u> |

|     |         |
|-----|---------|
| (1) | GTKLEIK |
| (2) | GTKLEIK |

(1) Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D (SEQ ID NO:3)

(2) Chuỗi nhẹ biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người (SEQ ID NO:68)

Fig. 11A

|     |                   |            |            |                   |            |
|-----|-------------------|------------|------------|-------------------|------------|
|     | 10                | 20         | 30         | 40                | 50         |
| (1) | DVQLVESGGG        | LVQPGGSRKL | SCAASGFTFS | SFGMHWVRQA        | FEKGLEWVAY |
| (2) | <u>EVQLVESGGG</u> | LVQPGGSIRL | SCAASGFTFS | <u>SFGMHWVRQA</u> | PGKGLEWVAY |

|     |                   |            |            |            |            |
|-----|-------------------|------------|------------|------------|------------|
|     | 60                | 70         | 80         | 90         | 100        |
| (1) | ISSDSSAIYY        | ADTVKGRFTI | SRDNPKNTLF | LQMTSLRSED | TAMYYCGRGR |
| (2) | <u>ISSDSSAIYY</u> | ADTVKGRFTI | SRDNAKNSLY | LQMTSLRSED | TAVYYCARGR |

|     |                   |            |    |    |    |
|-----|-------------------|------------|----|----|----|
|     | 110               | 120        | 84 | 89 | 93 |
| (1) | ENIYYGSRLD        | YWGQGTTLTV | SS |    |    |
| (2) | <u>ENIYYGSRLD</u> | YWGQGTTVTV | SS |    |    |

(1) Chuỗi nặng biến đổi BRCA84D (SEQ ID NO:11)

(2) Chuỗi nặng biến đổi BRCA84D-1 được làm giống người (SEQ ID NO:80)

Fig. 11B

17/36

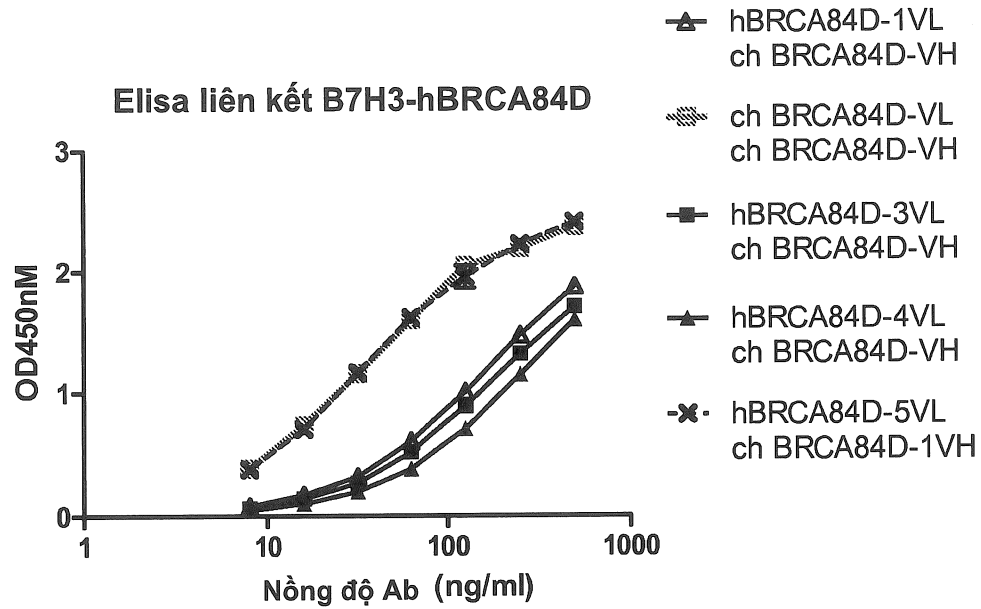


Fig. 12

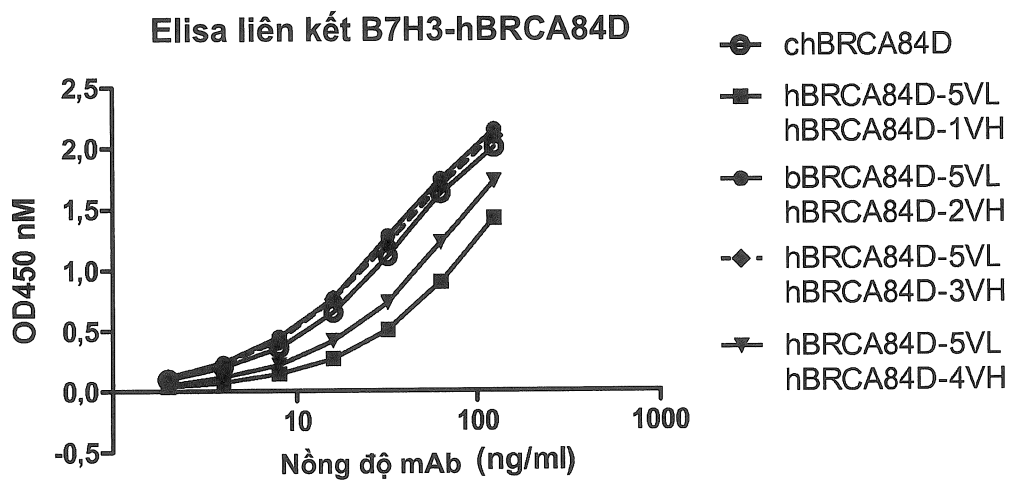


Fig. 13

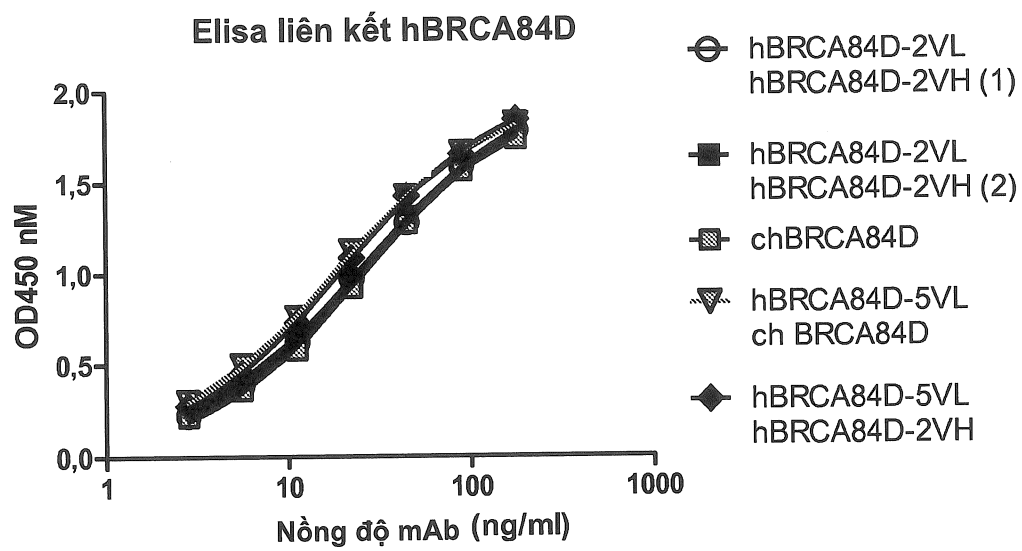


Fig. 14



## Carxinom bàng quang HT-1197

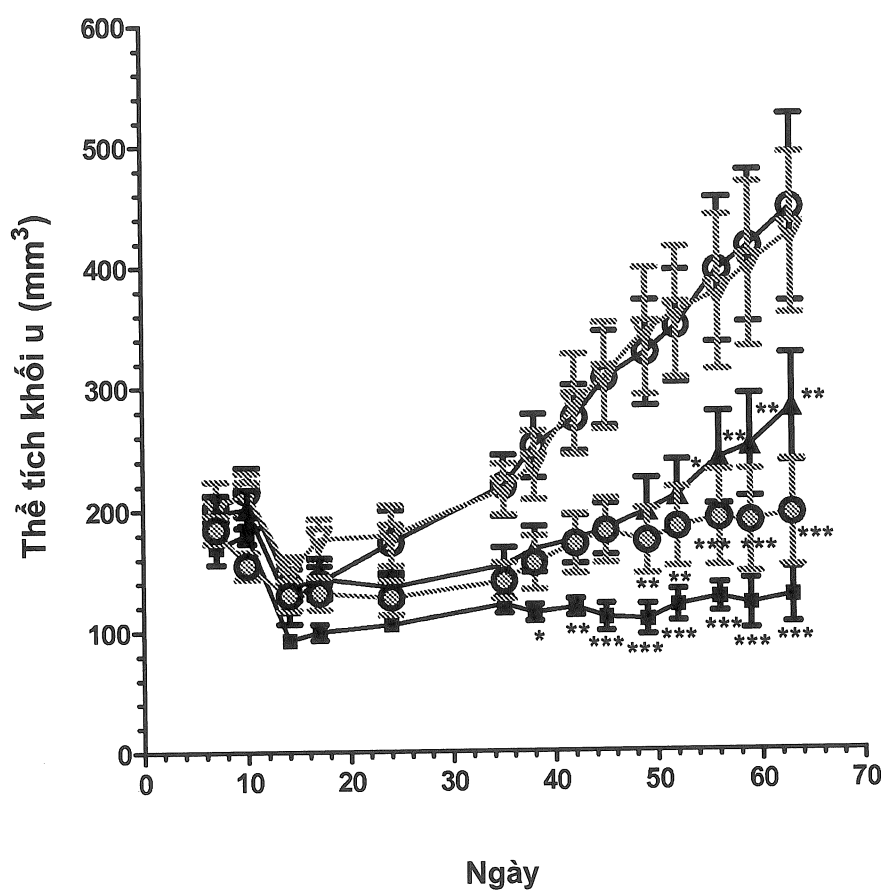
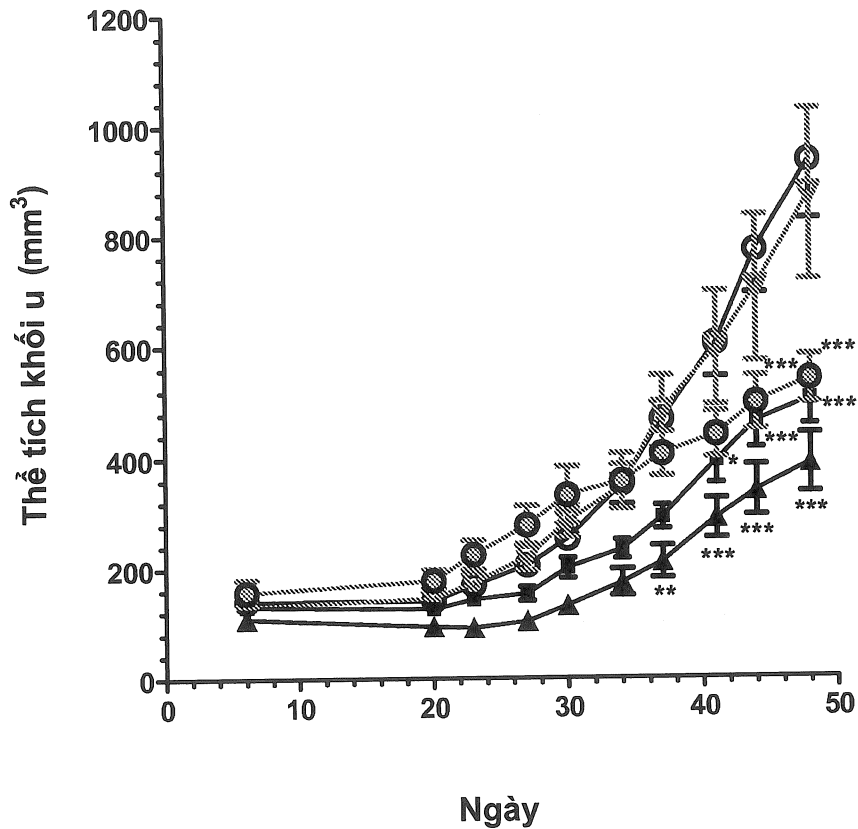


Fig. 15

## Tế bào carcinom thận A498



○ Chất dẫn thuốc

▨ Đối chứng Ig (10 mg/kg)

▲ hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, và P396L) (1 mg/kg)

■ hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, và P396L) (10 mg/kg)

● hBRCA84D-2 (L235V, F243L, R292P, Y300L, và P396L) (20 mg/kg)

Fig. 16

21/36

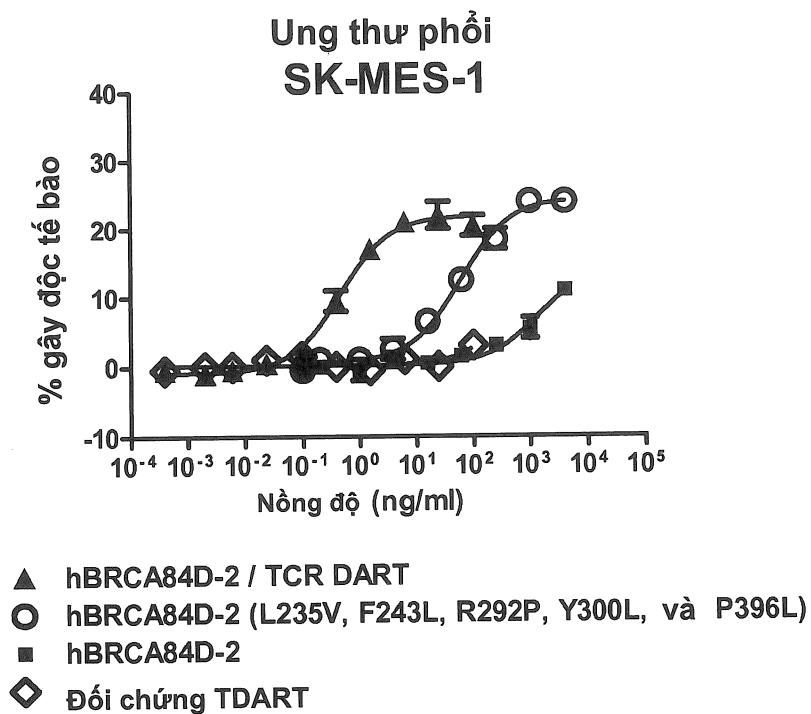


Fig. 17A

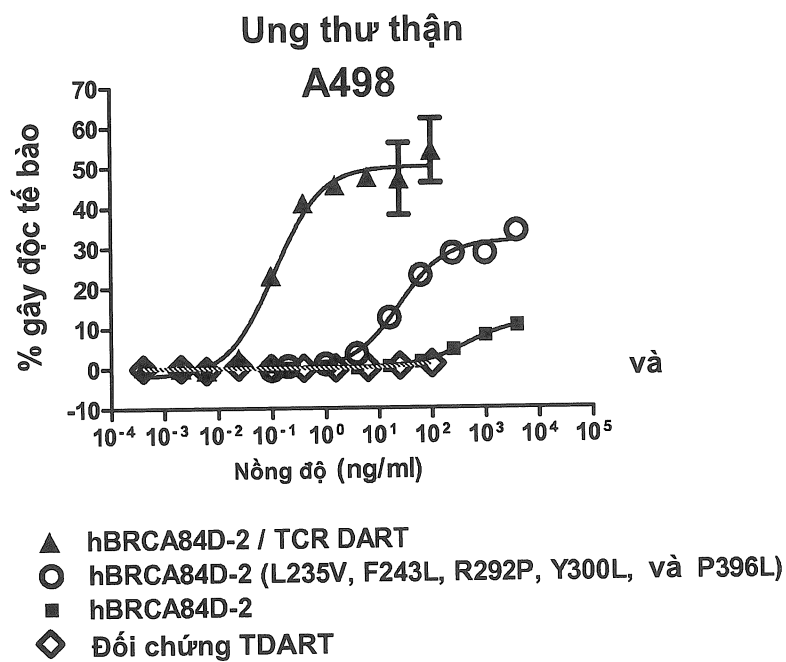


Fig. 17B

22/36

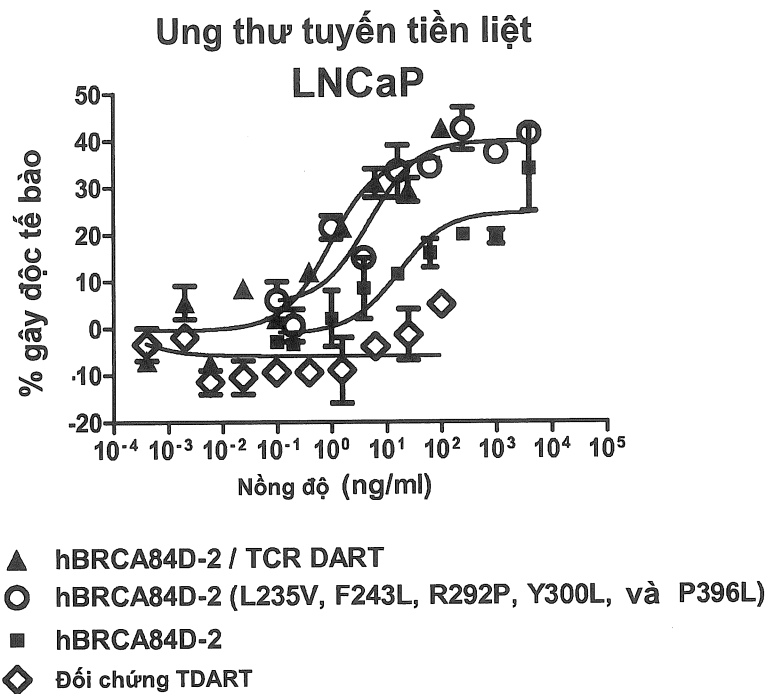


Fig. 17C

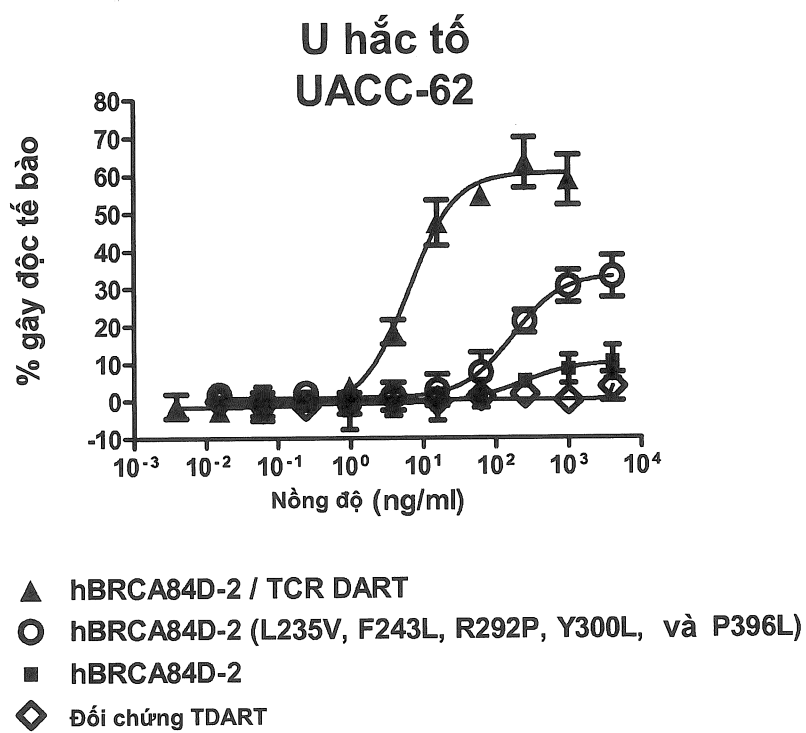


Fig. 17D

23/36

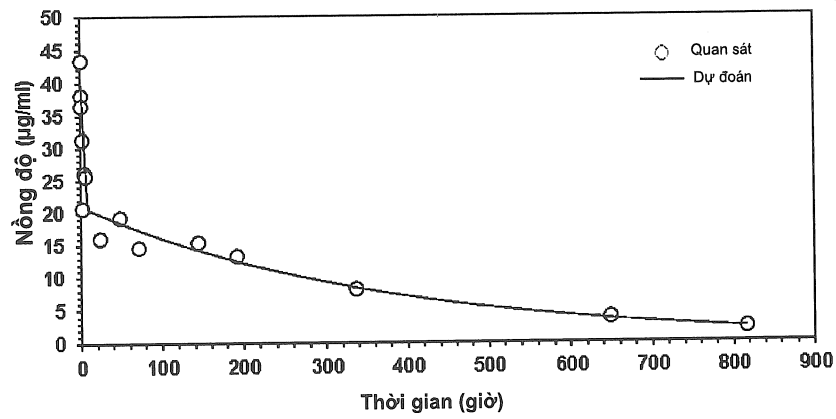


Fig. 18A

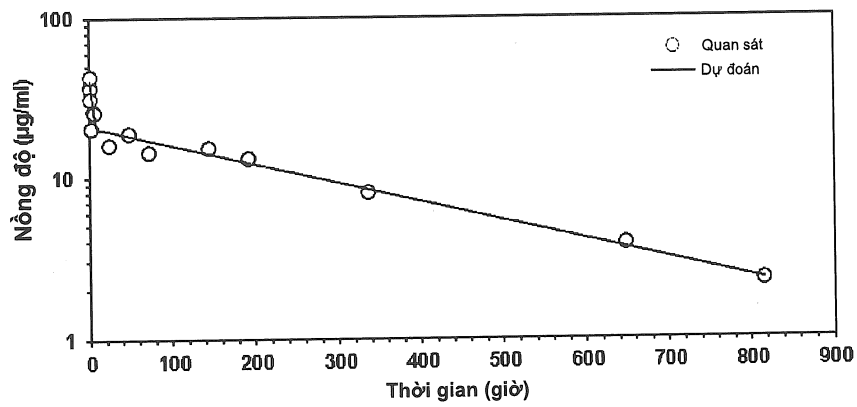


Fig. 18B

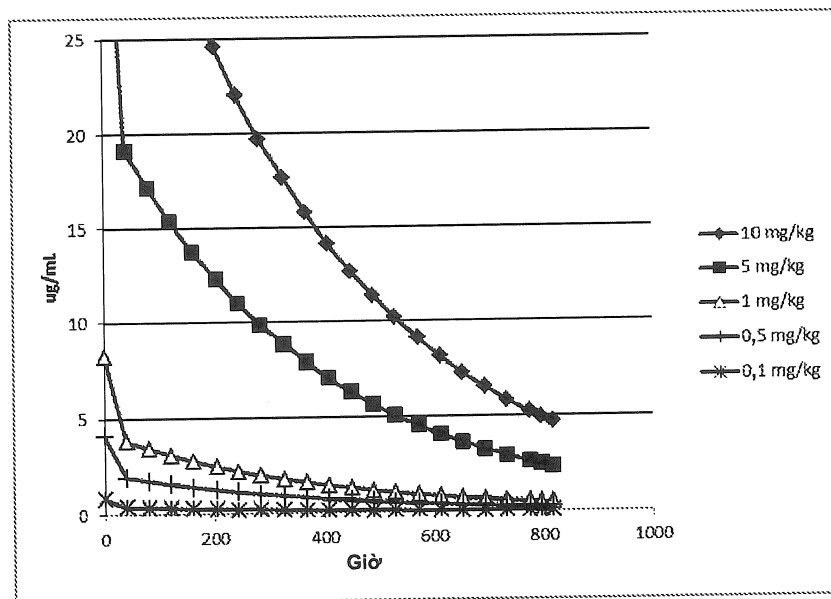


Fig. 18C

24/36

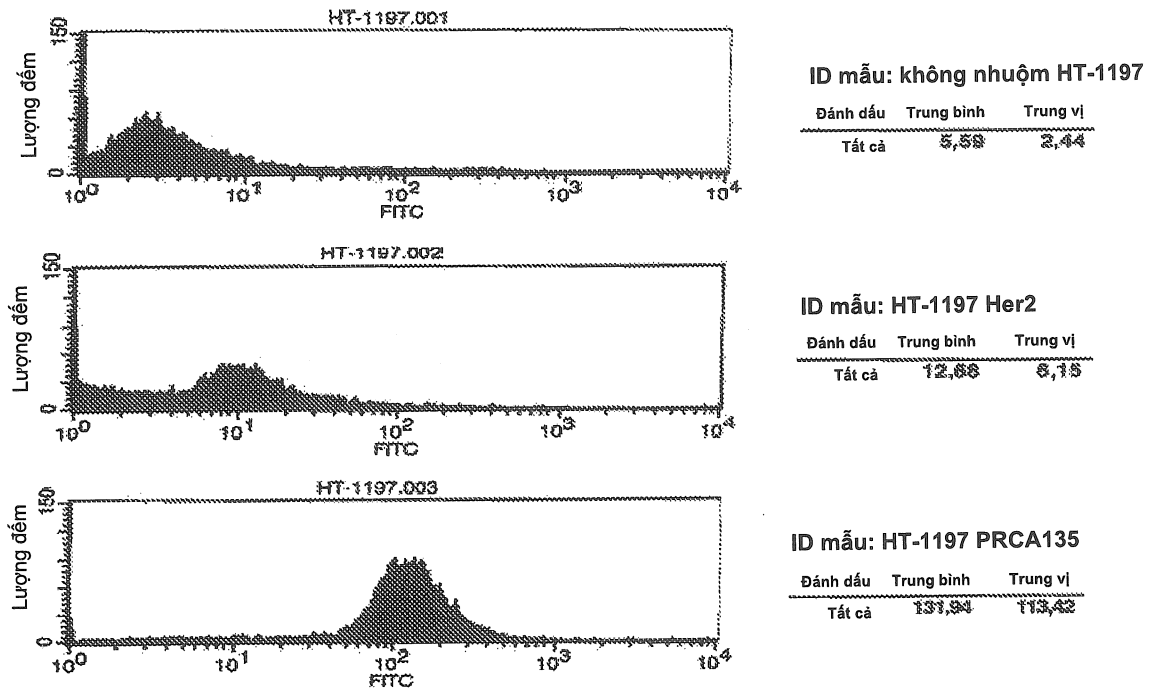


Fig. 19

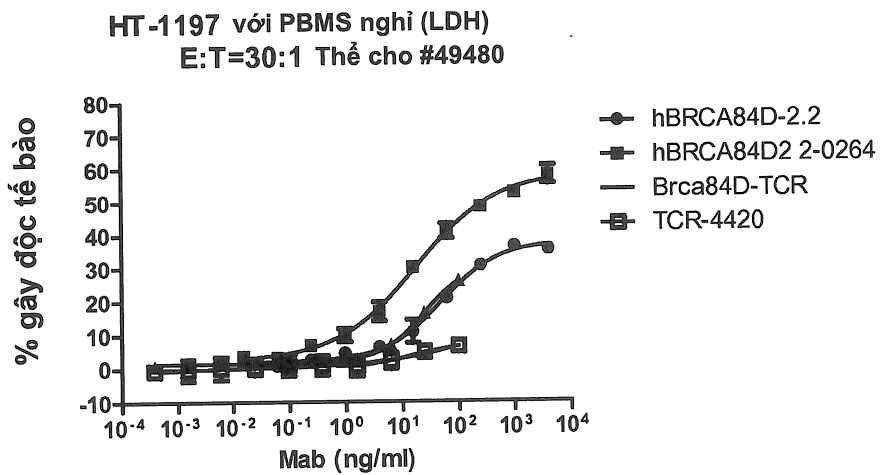


Fig. 20

25/36

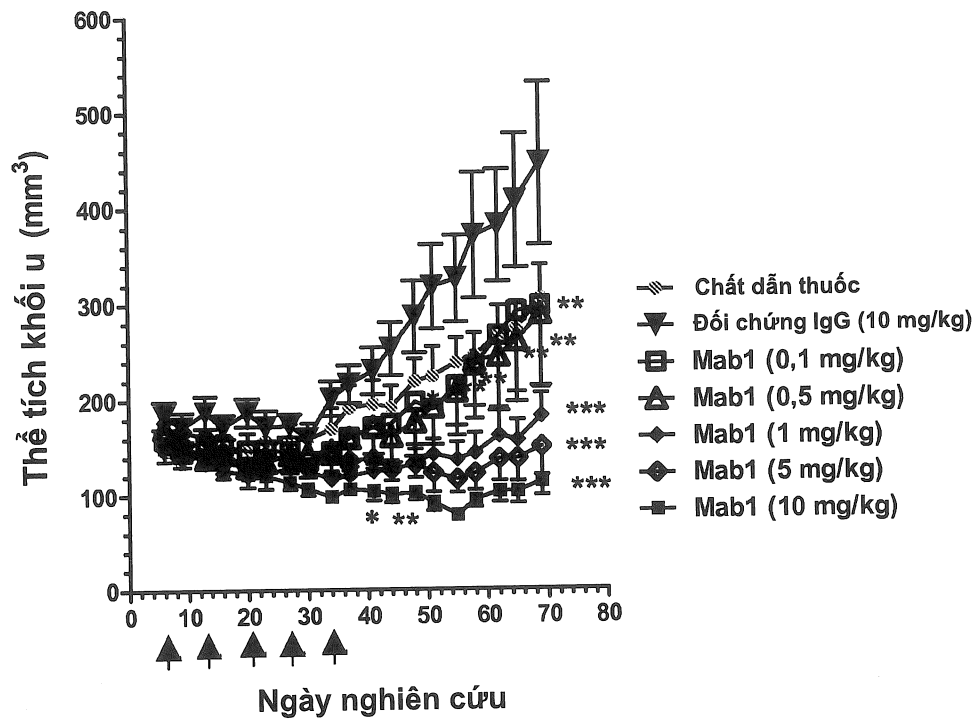


Fig. 21A

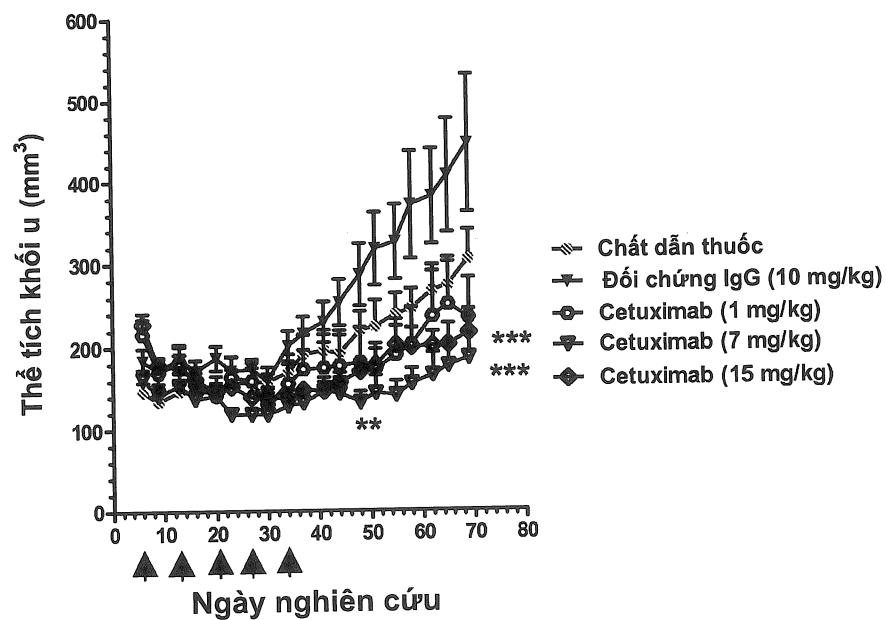


Fig. 21B

26/36

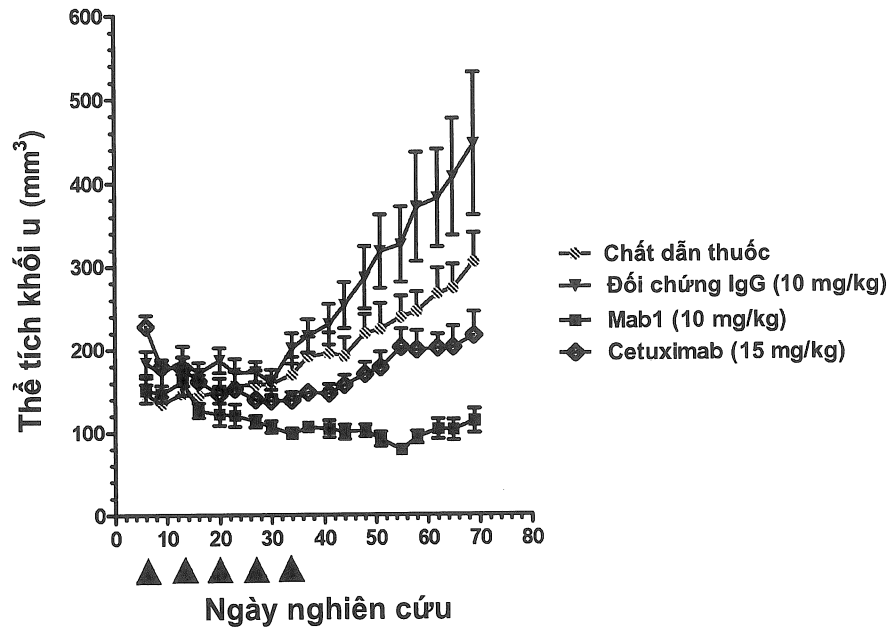


Fig. 21C

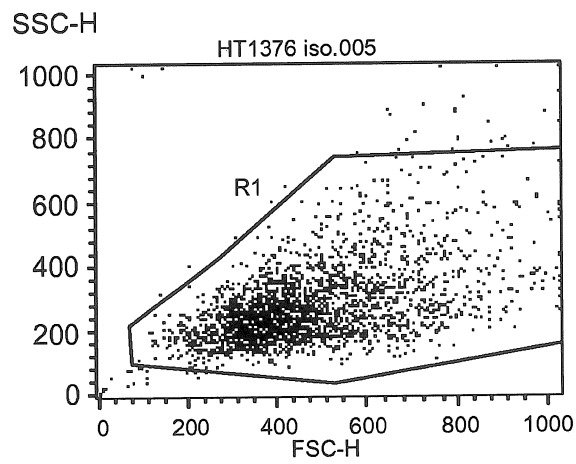


Fig. 22A



27/36

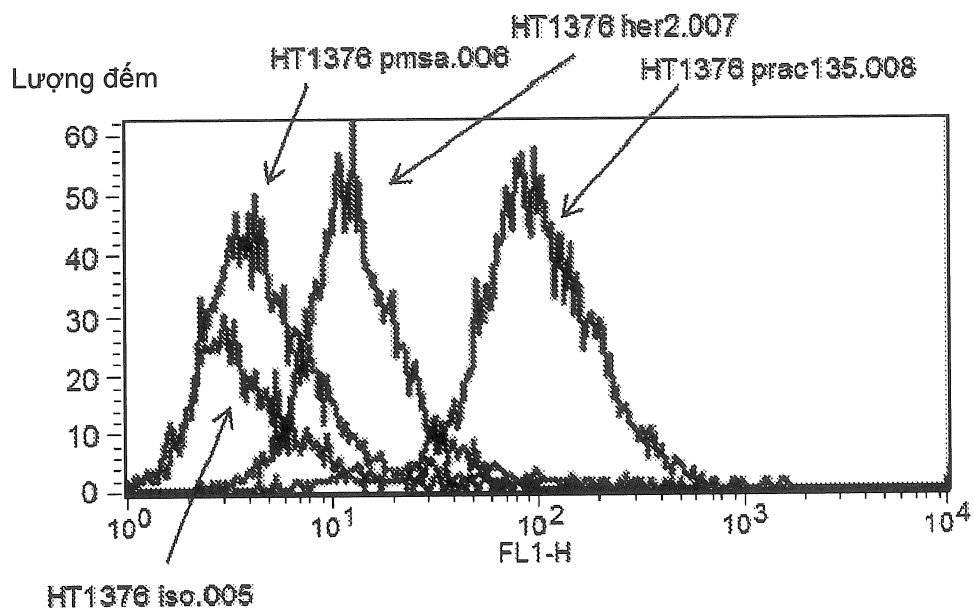


Fig. 22B

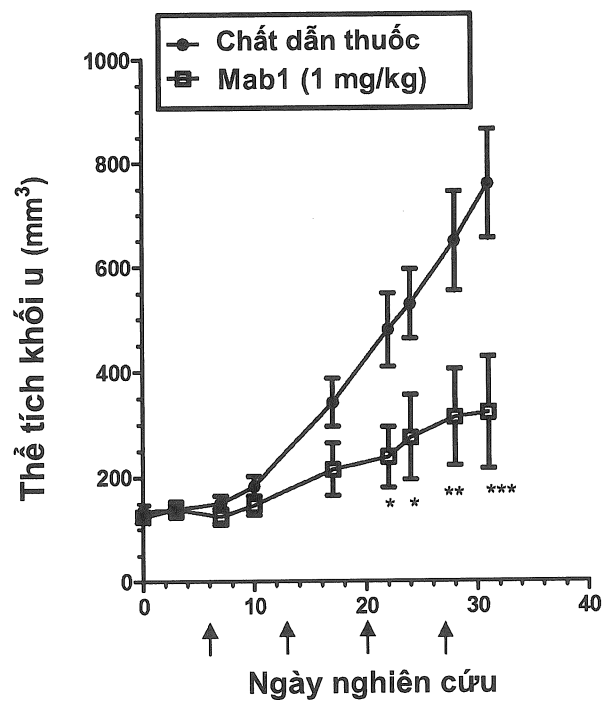


Fig. 23

28/36

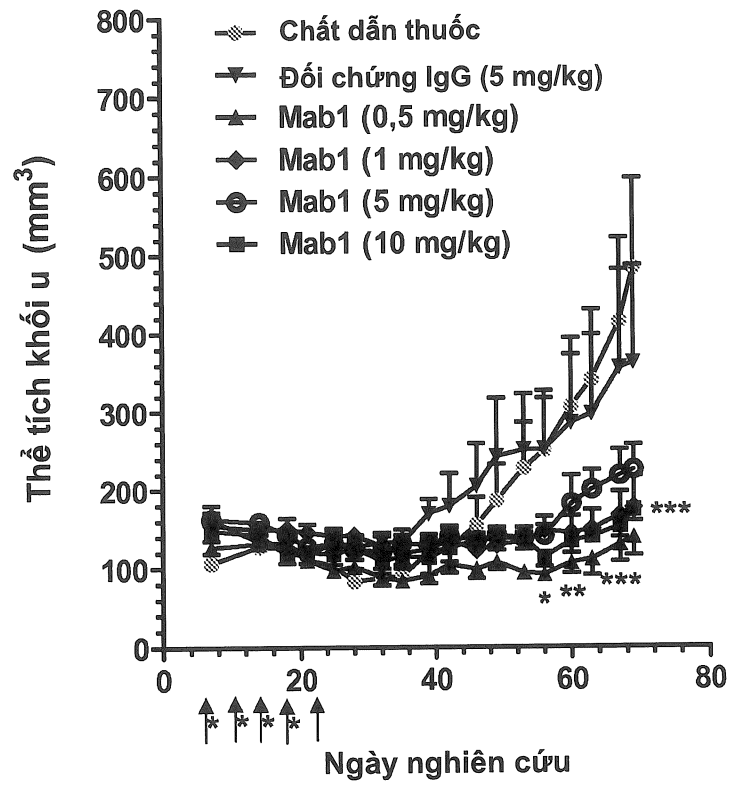


Fig. 24

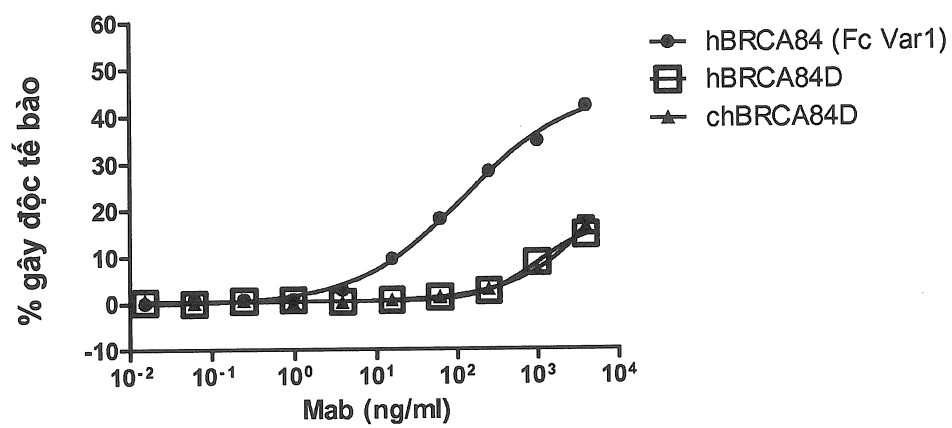


Fig. 25

29/36

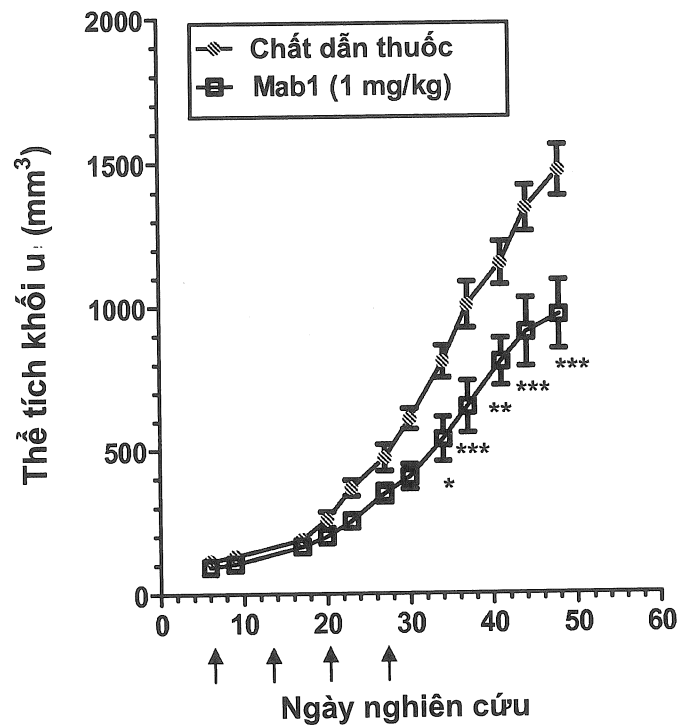


Fig. 26

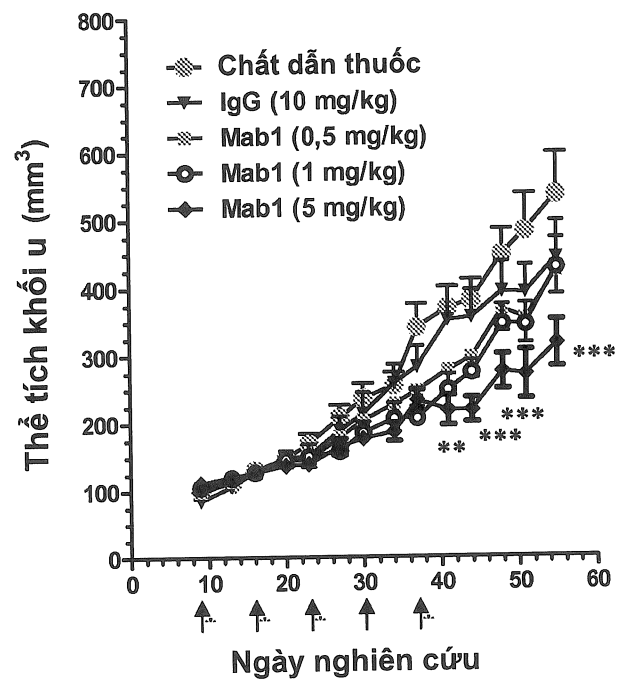


Fig. 27

30/36

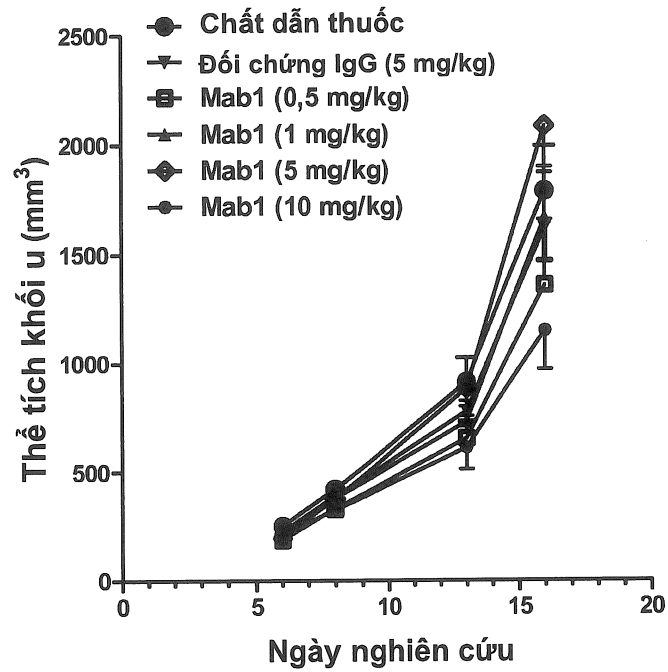


Fig. 28A

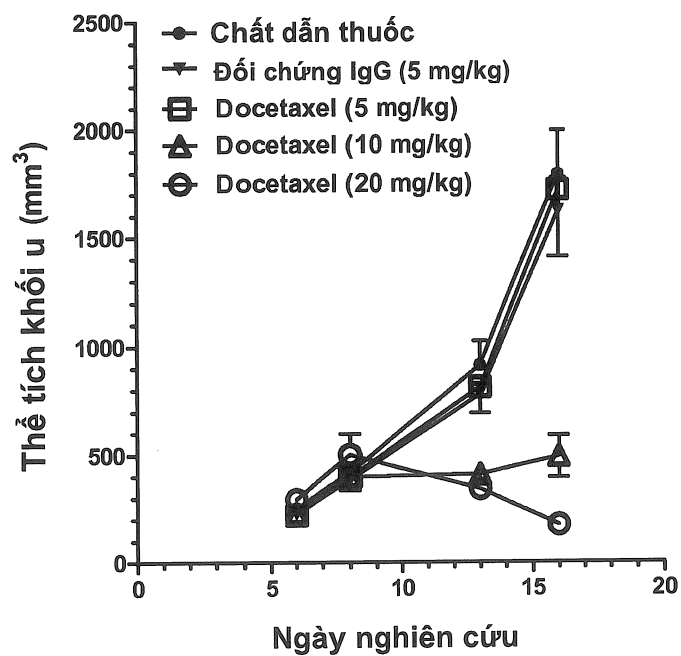


Fig. 28B

31/36

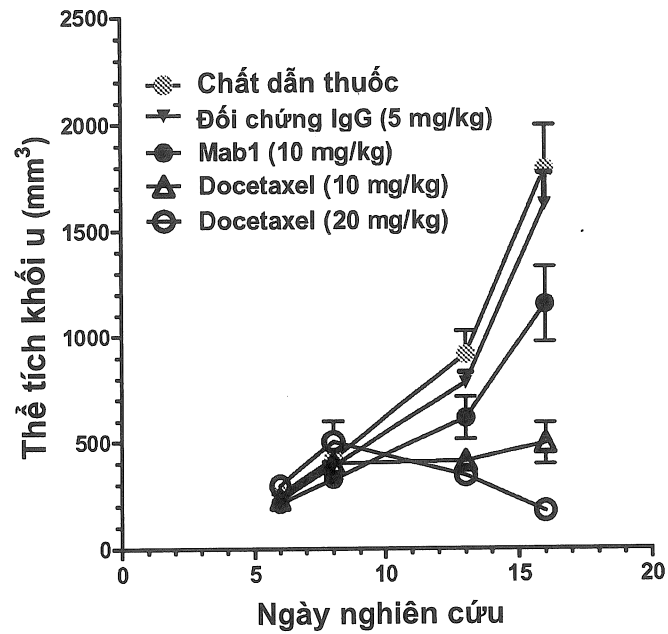


Fig. 28C

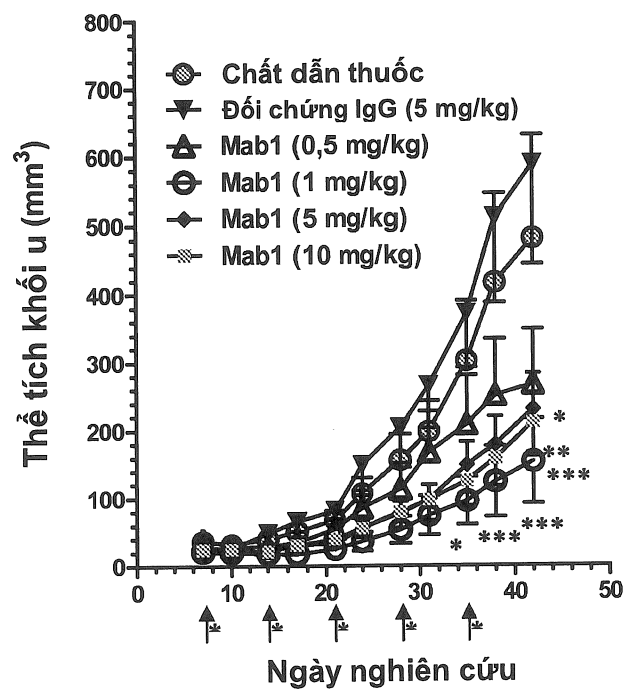


Fig. 29

32/36

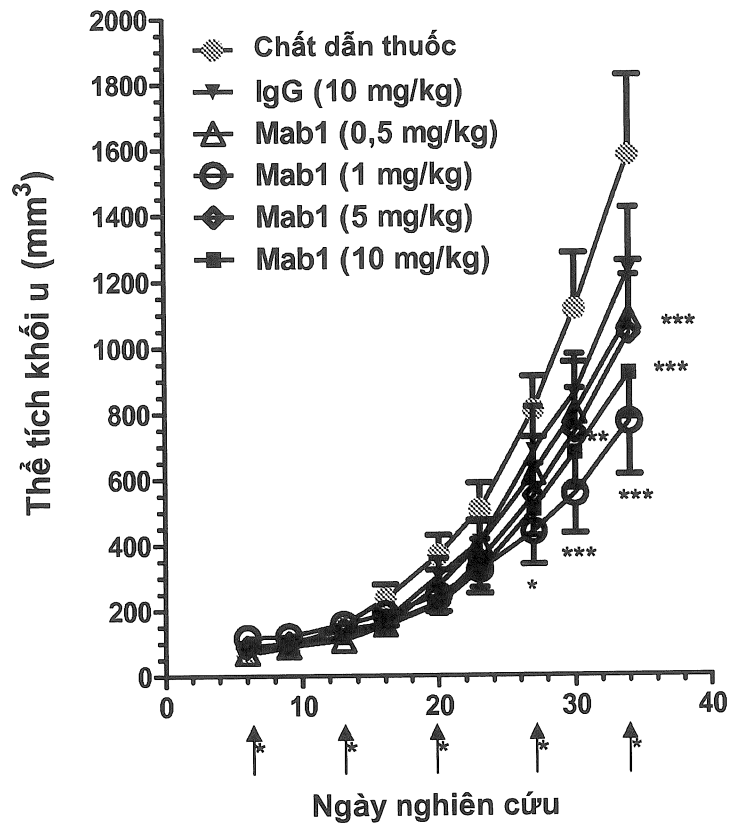


Fig. 30A

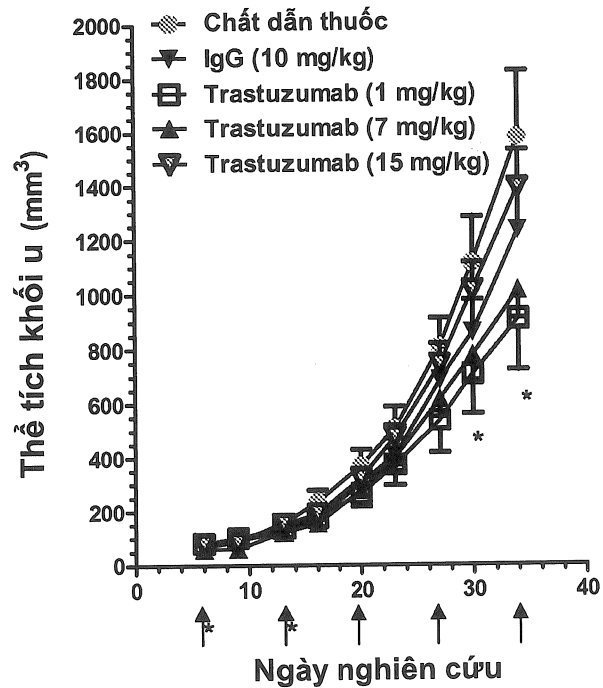


Fig. 30B

33/36

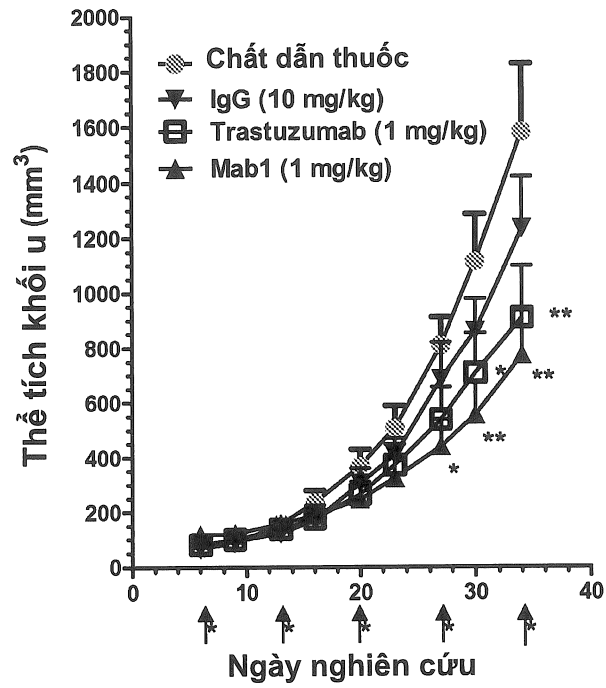


Fig.30C

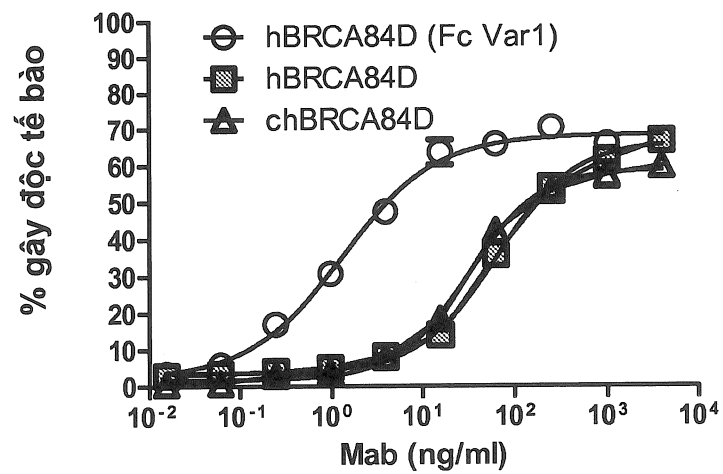


Fig. 31

34/36

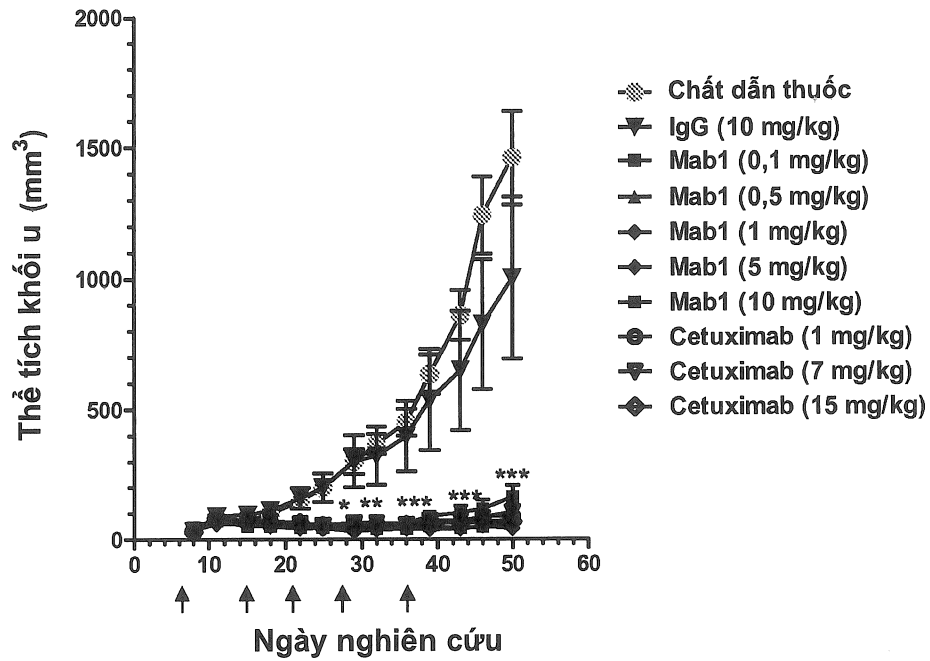


Fig. 32

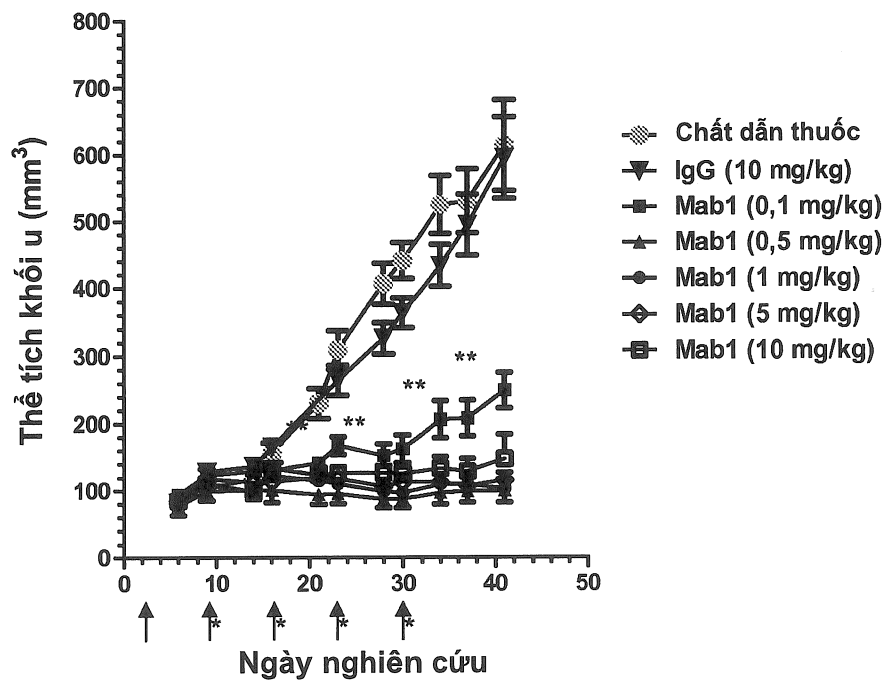


Fig. 33A



35/36

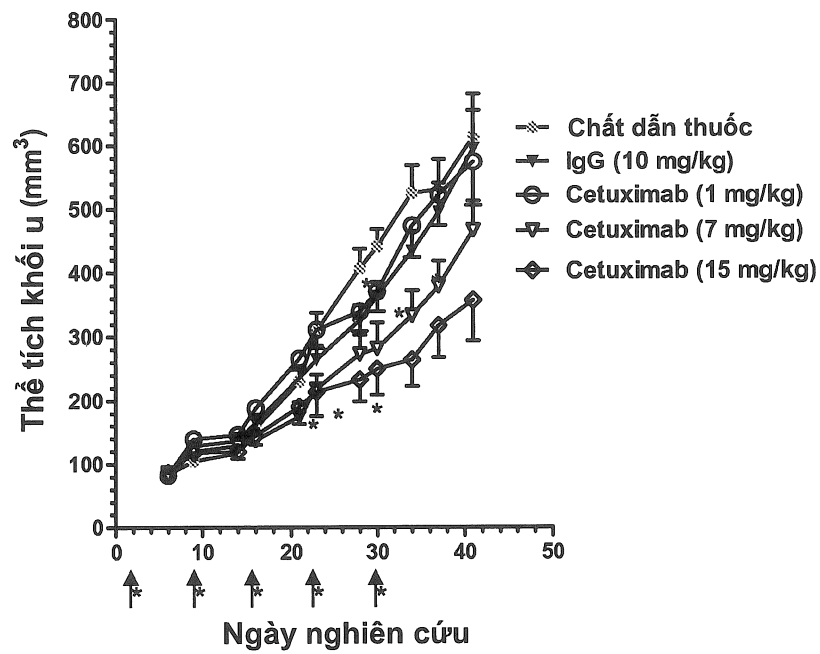


Fig. 33B

36/36

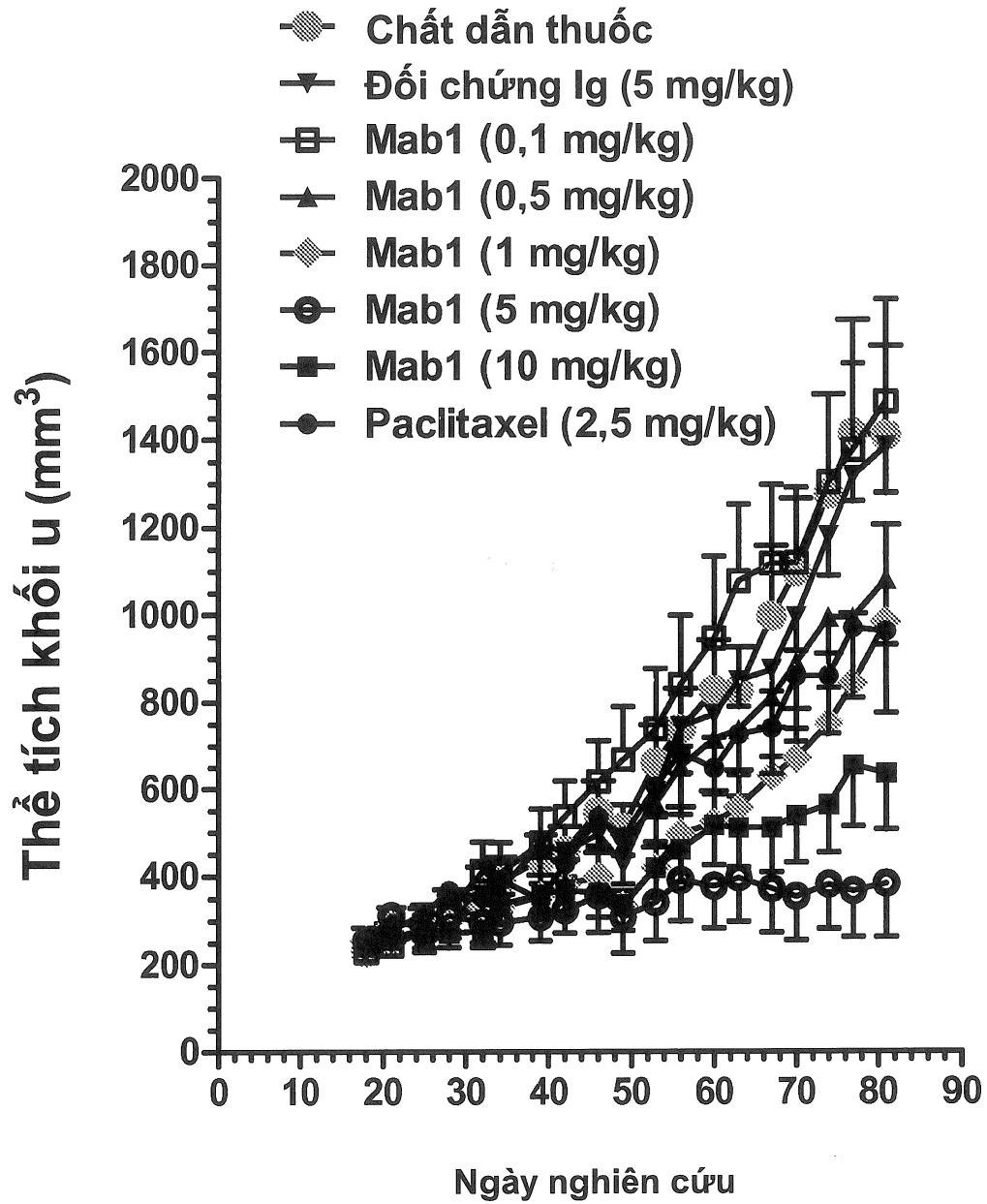


Fig. 34