



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

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

(11)



1-0030398

(51)⁷ C07K 16/28; C07K 16/46

(13) B

(21) 1-2009-00786

(22) 16/10/2007

(86) PCT/IB2007/004172 16/10/2007

(87) WO 2008/047242 A9 24/04/2008

(30) 06291628.3 19/10/2006 EP

(45) 25/12/2021 405

(43) 26/10/2015 331A

(73) SANOFI-AVENTIS (FR)

174, avenue de France, 75013 Paris, France

(72) Park Peter U (US); Bartle Laura M (GB); Skaletskaya Anna (FR); Golmakher Viktor S (FR); Tavares Daniel (US); Deckert Jutta (FR); Mikol Vincent (FR); Blanc Véronique (FR).

(74) Công ty TNHH Trần Hữu Nam và Đồng sự (TRAN H.N & ASS.)

(54) KHÁNG THỂ NHÂN HÓA HOẶC TÁI TẠO BỀ MẶT MÀ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU CD38

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể, kháng thể nhân hóa, các kháng thể tái tạo bề mặt, các đoạn gắn kết epitop của kháng thể, các kháng thể được dẫn xuất, và các thể liên hợp của chúng với các chất gây độc tế bào mà gắn kết đặc hiệu với CD38, có khả năng làm chết tế bào CD38+ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, gây độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC), và/hoặc gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Ngoài ra, sáng chế còn đề cập đến dược phẩm và chế phẩm điều trị chứa kháng thể này, bộ kit chứa kháng thể này, polynucleotit mã hóa polypeptit, vật truyền tái tổ hợp và tế bào chủ chứa vật truyền này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

CD38 là một glucoprotein xuyên màng loại II kD 45 với vùng ngoại bào đầu C dài và vùng tế bào chất đầu N ngắn. Protein CD38 là enzym ngoại bào hai chức năng mà có thể xúc tác cho quá trình chuyển đổi NAD^+ thành ADP-riboza (ADP-ribose) dạng vòng (cADPR) và cũng thủy phân cADPR thành ADP-riboza. Trong quá trình phát sinh cá thể, CD38 xuất hiện trên tế bào gốc được quy ước CD34^+ và dòng các nguyên bản được quy ước của các tế bào lympho, hồng cầu và tủy. Sự biểu hiện CD38 tồn tại hầu hết trong dòng lympho với mức độ biểu hiện khác nhau ở các giai đoạn khác nhau của sự phát triển tế bào T và B.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD38 được điều tiết trong nhiều khối u ác tính sinh huyết và các dòng tế bào dẫn xuất từ nhiều khối u ác tính sinh huyết, bao gồm u lympho của không Hodgkin (NHL), u lympho của Burkitt (BL), nhiều u tủy (MM), bệnh bạch cầu thể lympho mãn tính B (B-CLL), bệnh bạch cầu thể lympho cấp tính B và T (ALL), u lympho tế bào T (TCL), bệnh bạch cầu cấp tính dòng tủy (AML), bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), u lympho của Hodgkin (HL), và bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính (CML). Mặt khác, hầu hết các tế bào gốc đa năng gốc của hệ sinh huyết là CD38. Sự biểu hiện CD38 trong các khối u ác tính sinh huyết và liên quan đến sự tiến triển của bệnh tạo cho CD38 một mục tiêu hướng tới cho phương pháp trị liệu bằng kháng thể.

CD38 được biết là liên quan đến sự huy động ion Ca^{2+} (M. Morra et al., 1998, FASEB J., 12: 581-592; M. T. Zilber et al., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 2840-2845) và sự dẫn truyền tín hiệu thông qua quá trình phosphoryl hóa tyrosin của nhiều phân tử truyền tín hiệu, bao gồm phospholipaza C- γ , 2AP-70, syk, và c-cbl, trong các tế bào lympho và tế bào tủy hoặc các dòng tế bào (A. Funaro et al., 1993, Eur J Immunol, 23: 2407-2411 ; M. Morra et al., 1998, FASEB J., 12: 581-592; A. Funaro et al., 1990, J Immunol, 145: 2390-2396; M. Zubiaur et al., 1997, J Immunol,

159: 193-205; S. Deaglio et al., 2003, 8/ooc/102: 2146-2155; E. Todisco et al., 2000, Blood, 95: 535-542; M. Konopleva et al., 1998, J Immunol, 161: 4702-4708; M. T. Zilber et al., 2000, Proc Natl Acad Sci U S A, 97: 2840-2845; A. Kitanaka et al., 1997, J Immunol, 159: 184-192; A. Kitanaka et al., 1999, J Immunol, 162: 1952-1958; R. Mallone et al., 2001, Int Immunol, 13: 397-409). Trên cơ sở những quan sát này, CD38 được đề xuất là một phân tử truyền tín hiệu quan trọng trong sự phát triển và hoạt động của các tế bào lympho và tế bào tủy trong quá trình phát triển bình thường của chúng.

Vai trò chính xác của CD38 trong việc dẫn truyền tín hiệu và sinh huyết vẫn chưa rõ ràng, đặc biệt vì hầu hết những nghiên cứu dẫn truyền tín hiệu này đã sử dụng những dòng tế bào biểu hiện lạc vị CD38 và các kháng thể đơn dòng kháng CD38 là những phối tử không có chức năng sinh lý. Do protein CD38 có hoạt chất enzym tạo ra cADPR, phân tử có thể tạo ra sự huy động Ca^{2+} (H. C. Lee et al., 1989, J Biol Chem, 264: 1608-1615; H. C. Lee and R. Aarhus, 1991, Cell Regul, 2: 203-209), được đề xuất rằng việc thất bại CD38 bằng các kháng thể đơn dòng tạo ra sự huy động Ca^{2+} và sự dẫn truyền tín hiệu trong tế bào lympho bằng cách gia tăng sự sản xuất cADPR (H. C. Lee et al., 1997, Adv Exp Med Biol, 419: 411-419). Trái với giả thuyết này, phân tích điểm đột biến và cắt của protein CD38 cho thấy rằng không phải đoạn tế bào chất cũng không phải hoạt tính enzym là cần thiết được làm trung gian truyền tín hiệu bằng các kháng thể kháng CD38 (A. Kitanaka et al., 1999, J Immunol, 162: 1952-1958; F. E. Lund et al., 1999, J Immunol, 162: 2693-2702; S. Hoshino et al., 1997, J Immunol, 158, 741-747).

Bằng chứng tốt nhất cho chức năng của CD38 là những con chuột được tách CD38", mà thiếu khả năng miễn dịch bẩm sinh của chúng và phản ứng dịch độc lập của tế bào T đã giảm do khiếm khuyết trong quá trình di chuyển tế bào đuôi gai (S. Partida-Sanchez et al., 2004, Immunity, 20: 279-291; S. Partida-Sanchez et al., 2001, Nat Med, 7: 1209-1216). Tuy nhiên, thật không rõ ràng nếu chức năng CD38 ở những con chuột là giống với ở người vì mẫu biểu hiện CD38 trong quá trình sinh huyết khác biệt lớn giữa người và chuột: a) không giống như những tế bào gốc nguyên bản chưa trưởng thành ở người, những tế bào gốc nguyên bản tương tự như

vậy ở chuột biểu hiện mức độ CD38 lớn (T. D. Randall et al., 1996, *Blood*, 87: 4057-4067; R. N. Dagher et al., 1998, *Biol Blood Marrow Transplant*, 4: 69- 74), b) trong khi đó trong quá trình phát triển tế bào B ở người, mức độ biểu hiện CD38 cao được thấy ở các tế bào B trung tâm thời kỳ phôi thai và các tế bào plasma (F. M. Uckun, 1990, *Blood*, 76: 1908- 1923; M. Kumagai et al., 1995, *J Exp Med*, 181: 1101-1110), ở chuột, mức độ biểu hiện CD38 trong các tế bào tương ứng là thấp (A. M. Oliver et al., 1997, *J Immunol*, 158: 1108-1115; A. Ridderstad and D. M. Tarlinton 1998, *J Immunol*, 160: 4688-4695).

Một vài kháng thể CD38 kháng cơ thể người với những đặc tính tăng sinh khác nhau trên nhiều tế bào ung thư (tumor cells) và các dòng tế bào đã được mô tả trong tài liệu này. Chẳng hạn, kháng thể OKT10 dạng khảm với chuột Fab và người IgG1 Fc làm trung gian gây độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC) kháng lại các tế bào lympho rất hiệu quả với sự có mặt của các tế bào kích thích đơn nhân máu ngoại vi từ các bệnh nhân MM hoặc những người bình thường (F. K. Stevenson et al 1991, *Blood*, 77: 1071-1079). Phiên bản nhân hóa cấy ghép CDR ở người của kháng thể kháng CD38 AT13/5 được chỉ ra là có hoạt tính ADCC tiềm năng kháng lại các dòng tế bào CD38 dương tính (US 09/797,941 A1). Các kháng thể kháng CD38 đơn dòng ở người được chỉ ra làm trung gian trong việc làm chết các dòng tế bào CD38 dương tính in vitro (trong ống nghiệm) bằng cơ chế ADCC và/hoặc gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), và làm trì hoãn sự phát triển khối u trong chuột SCID tạo ra dòng tế bào MM RPMI-8226 (WO2005/103083 A2). Mặt khác, một vài kháng thể kháng CD38, IB4, SUN-4B7, và OKT10 trừ IB6, AT1, hoặc AT2, tạo ra sự tăng sinh của các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) từ những người bình thường (C. M. Ausiello et al. 2000, *Tissue Antigens*, 56: 539-547).

Một vài kháng thể của tình trạng kỹ thuật trước đã được chỉ ra là có khả năng tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào CD38⁺ B. Tuy nhiên, chúng có thể chỉ thực hiện được như vậy với sự có mặt của các tế bào nền (stroma cells) hoặc các xytokin dẫn xuất từ tế bào nền. Kháng thể kháng CD38 không tự nhiên (IB4) được biết đến là ngăn chặn cơ chế gây chết tế bào theo chương trình của các tế bào B trung tâm thời kỳ phôi thai ở người (GC) (S. Zupo et al. 1994, *Eur J*

Immunol, 24: 1218-1222), và tạo ra sự tăng sinh của các tế bào KG-1 và HL-60 AML (M. Konopleva et al. 1998, J Immunol, 161: 4702-4708), tuy nhiên lại tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong các tế bào nguyên bào lympho T Jurkat (M. Morra et al. 1998, FASEB J, 12: 581-592). Kháng thể kháng CD38 T16 khác đã tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình của các tế bào lympho chưa trưởng thành và các tế bào nguyên bào lympho ở bệnh bạch cầu từ bệnh nhân ALL (M. Kumagai et al. 1995, J Exp Med, 181: 1101-1110), và các tế bào nguyên tủy bào ở bệnh bạch cầu từ các bệnh nhân AML (E. Todisco et al. 2000, Blood, 95: 535- 542), tuy nhiên T16 lại tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình chỉ khi có mặt của các tế bào nền hoặc các xytokin dẫn xuất từ tế bào nền (IL-7, IL-3, yếu tố tế bào gốc).

Mặt khác, một vài kháng thể trong tình trạng kỹ thuật trước tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình sau khi liên kết chéo, tuy nhiên tránh được hoàn toàn bất kỳ hoạt động của cơ chế gây chết tế bào nào khi được ủ một mình (WO 2006/099875).

Do CD38 là một mục tiêu hướng đến để điều trị bằng kháng thể đối với nhiều khối u ác tính sinh huyết, các tác giả sáng chế đã tạo ra và sàng lọc lượng lớn kháng thể CD38 kháng cơ thể người có hiệu quả cao trong ba hoạt tính gây độc tế bào kháng lại các tế bào của khối u ác tính sinh huyết CD38 dương tính: tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC và CDC. Sáng chế mô tả những kháng thể kháng CD38 mới có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ bằng ba cơ chế gây độc tế bào khác nhau: tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC và CDC. Đáng kể hơn, sáng chế đề cập đến những kháng thể kháng CD38 đầu tiên có khả năng trực tiếp tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình các tế bào CD38⁺, thậm chí không cần sự có mặt của các tế bào nền hay các xytokin dẫn xuất từ tế bào nền.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Mục đích của sáng chế là đề xuất các kháng thể liên kết đặc hiệu với CD38, và khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình. Trong khi đó một vài kháng thể của tình trạng kỹ thuật trước có khả năng tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình chỉ khi được liên kết chéo, tuy nhiên, mặt khác

không có bất kỳ hoạt động của cơ chế gây chết tế bào nào, các kháng thể theo sáng chế có khả năng tạo ra các tế bào đã chết của cơ chế gây chết tế bào của các tế bào CD38⁺ thậm chí khi chúng được ủ một mình. Theo khía cạnh khác của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ B bằng ADCC hoặc CDC. Theo khía cạnh khác nữa, các kháng thể theo sáng chế có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ bằng ít nhất hai trong số những cơ chế nêu trên, tức là cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC và CDC. Đáng kể hơn, các kháng thể theo sáng chế là những kháng thể kháng CD38 đầu tiên được chứng minh là có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ B bằng tất cả ba cơ chế khác nhau: cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC và CDC. Theo phương án thực hiện khác nữa của sáng chế, các kháng thể nêu trên có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ B bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình thậm chí không cần sự có mặt của các tế bào nền hoặc các xytokin dẫn xuất từ tế bào nền.

Các kháng thể theo sáng chế có khả năng đặc biệt là làm chết các tế bào u ác tính CD38⁺ B, bao gồm cả tế bào lympho, tế bào bệnh bạch cầu và các tế bào đa u tủy. Theo một số phương án, tế bào CD38⁺ B là tế bào NHL, BL, MM, B-CLL₁ ALL, TCL, AML, HCL, HL, hoặc CML.

Theo một khía cạnh của sáng chế, các kháng thể theo sáng chế có khả năng làm chết ít nhất 24% các tế bào lympho Daudi và/hoặc ít nhất 7% tế bào lympho Ramos và/hoặc 11% tế bào đa u tủy MOLP-8 và/hoặc 36% tế bào lympho SU-DHL-8 và/hoặc 62% tế bào bệnh bạch cầu DND-41 và/hoặc 27% tế bào lympho NU-DUL-1 và/hoặc 9% tế bào bệnh bạch cầu JVM-13 và/hoặc 4% tế bào bệnh bạch cầu HC-1 bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình mà không cần sự có mặt của các tế bào nền hay các xytokin dẫn xuất từ tế bào nền.

Các kháng thể theo sáng chế có thể là đa dòng hoặc đơn dòng. Được ưu tiên là các kháng thể kháng CD38 đơn dòng. Theo phương án được ưu tiên khác, có những kháng thể ở loài chuột được đề cập được chọn từ 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39, có đặc điểm đầy đủ tương ứng với các trình tự axit amin của cả hai vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ của chúng, các trình tự gen cADN của những vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ, đồng nhất CDRs của chúng (tính bỏ

sung- những vùng quyết định), đồng nhất các axit amin trên bề mặt của chúng, và các phương án biểu hiện của chúng ở dạng tái tổ hợp.

Sáng chế bao gồm các kháng thể khản thuộc kháng thể đơn dòng kháng CD38 ở chuột được chọn từ 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39. Cũng được đề cập trong sáng chế là các kháng thể nhân hóa và tái tạo bề mặt của các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39, trong đó, các chất còn lại trên bề mặt của khung vùng biến đổi của các kháng thể, hoặc những đoạn liên kết epitop của chúng được thay thế trong cả chuỗi nặng và nhẹ để gần giống hơn với những bề mặt kháng thể đã biết ở người. Các kháng thể nhân hóa và những đoạn liên kết epitop của chúng trong sáng chế có những đặc tính được cải thiện trong đó chúng ít gây miễn dịch hơn (hoặc hoàn toàn không gây miễn dịch) so với những phiên bản ở loài chuột, ở những đối tượng là người trong đó chúng được áp dụng. Do đó, những phiên bản khác nhau của những kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 và các đoạn liên kết epitop của chúng trong sáng chế nhận ra CD38 một cách cụ thể trong khi không gây miễn dịch đối với người.

Những phiên bản kháng thể nhân hóa của các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 theo sáng chế có đặc tính đầy đủ tương ứng với các trình tự axit amin tương ứng của cả vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ, trình tự AND của những gen cho những vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ, đồng nhất những vùng quyết định tính bổ sung (CDRs), đồng nhất những dư lượng axit amin trên bề mặt khung của vùng biến đổi của chúng và bộc lộ các phương án biểu hiện của chúng ở dạng tái tổ hợp.

Sáng chế cũng đề cập đến việc sử dụng liên hợp giữa các thể liên hợp gây độc tế bào bao gồm (1) chất liên kết tế bào nhận ra và liên kết CD38, và (2) chất gây độc tế bào. Trong các thể liên hợp gây độc tế bào, chất liên kết tế bào có ái lực cao đối với CD38 và chất gây độc tế bào có độ gây độc tế bào cao đối với việc biểu hiện tế bào CD38, sao cho những thể liên hợp gây độc tế bào của sáng chế tạo lên những chất làm chết hiệu quả.

Theo phương án được ưu tiên, chất liên kết tế bào là kháng thể kháng CD38 (chẳng hạn như 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39) hoặc đoạn

liên kết epitop của chúng, tốt hơn nữa là một kháng thể kháng CD38 được nhân hóa (ví dụ như 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39) hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, trong đó chất gây độc tế bào được liên kết cộng hóa trị, trực tiếp hoặc thông qua chất liên kết có thể tách được hoặc không thể tách được, với kháng thể hoặc đoạn liên kết epitop của chúng. Theo phương án được ưu tiên hơn, chất liên kết tế bào là các kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 và 38SB39 hoặc đoạn liên kết epitop của chúng, và chất gây độc tế bào là taxol, maytansinoid, dẫn xuất tomaymyxin, dẫn xuất leptomyxin, CC-1065 hoặc chất tương tự CC-1065.

Tốt hơn nữa là, chất liên kết tế bào là kháng thể kháng CD38 được nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39, và chất gây độc tế bào là hợp chất maytansin, chẳng hạn như DM1 hoặc DM4.

Sáng chế cũng bao gồm việc sử dụng các đoạn kháng thể kháng CD38 duy trì được khả năng liên kết CD38. Theo khía cạnh khác của sáng chế, việc sử dụng những kháng thể kháng CD38 có chức năng tương tự cũng được đề cập.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp ức chế sự phát triển của biểu hiện tế bào CD38. trong các phương án được ưu tiên, phương pháp ức chế sự phát triển của biểu hiện tế bào CD38 diễn ra in vivo (trong cơ thể) và làm chết tế bào, mặc dù những áp dụng in vivo và ex vivo (ngoài ống nghiệm) cũng được đề cập.

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm trị liệu chứa kháng thể kháng CD38 hoặc kháng thể kháng CD38 liên hợp với chất gây độc tế bào, và chất mang hoặc tá dược được dùng. Theo một số phương án, chế phẩm trị liệu chứa chất trị liệu thứ hai. Chất trị liệu thứ hai này có thể được chọn từ nhóm gồm có chất đối vận của yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố mô (TF), protein C, protein S, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), heregulin, protein kích thích đại thực bào (MSP) hoặc yếu tố tăng trưởng nội mô tim (VEGF) hoặc chất đối vận của thụ thể đối với yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố mô (TF), protein C, protein S, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), heregulin, protein kích thích đại thực bào (MSP) hoặc yếu tố

tăng trưởng nội mô tim (VEGF), bao gồm thụ thể HER2, thụ thể HER3, c-MET, và thụ thể tyrosin kinaza khác. Chất trị liệu thứ hai này cũng có thể được chọn từ nhóm gồm có các kháng thể hướng đến các cụm kháng nguyên biệt hóa (CD) bao gồm CD3, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40, CD44, CD52, CD55, CD59, CD56, CD70, CD79, CD80, CD103, CD134, CD137, CD138, và CD152. Chất trị liệu thứ hai này cũng có thể được chọn từ nhóm các chất hóa học trị liệu hoặc chất điều biến miễn dịch.

Sáng chế cũng đề cập đến phương pháp điều trị cho đối tượng bị bệnh ung thư hoặc bệnh viêm nhiễm, bao gồm bệnh tự miễn dịch sử dụng chế phẩm trị liệu. Theo một số phương án, bệnh ung thư được chọn từ nhóm bao gồm NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL, và CML.

Theo khía cạnh khác, bệnh tự miễn dịch được chọn từ nhóm bao gồm bệnh lupus ban đỏ toàn thân, bệnh đa xơ cứng, viêm khớp dạng thấp, bệnh Crohn, viêm loét đại tràng, viêm dạ dày, viêm tuyến giáp Hashimoto, viêm cột sống dính khớp, viêm mạch globulin lạnh trong máu liên quan đến viêm gan C, viêm não khu trú mãn tính, bỏng rộp dạng pemphigus, bệnh máu khó đông A, viêm cầu thận tăng sinh màng, hội chứng Sjogren, viêm da cơ ở trẻ vị thành niên và người lớn, viêm da cơ ở người lớn, mày đay mãn tính, viêm xơ gan ống mật, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, viêm dây thần kinh tủy, bệnh loạn năng tuyến giáp dạng Grave, bỏng rộp dạng pemphigus, viêm cầu thận tăng sinh màng, hội chứng Churg-Strauss, và bệnh hen suyễn. Trong những phương án được ưu tiên, thể liên hợp gây độc tế bào bao gồm kháng thể kháng CD38 và chất gây độc tế bào.

Trong những phương án được ưu tiên khác, thể liên hợp gây độc tế bào bao gồm thể liên hợp của kháng thể nhân hóa DM138SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39, kháng thể nhân hóa DM4 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 hoặc thể liên hợp của kháng thể nhân hóa taxan 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39, và thể liên hợp được áp dụng cùng với chất mang hoặc tá dược được dùng.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, kháng thể kháng CD38 được dùng để phát hiện protein CD38 trong mẫu sinh học. Theo phương án được ưu tiên, các kháng thể nêu trên được dùng để xác định mức độ CD38 trong mô khối u.

Sáng chế cũng đề cập đến bộ kit bao gồm kháng thể kháng CD38 hoặc liên hợp của kháng thể kháng CD38-chất gây độc tế bào và những hướng dẫn sử dụng. trong những phương án được ưu tiên, các kháng thể kháng CD38 là những kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39, chất gây độc tế bào là hợp chất maytansin, chẳng hạn như DM4 hoặc DM1, dẫn xuất tomaymycin, dẫn xuất leptomycin, hoặc taxan và những hướng dẫn sử dụng liên hợp để điều trị cho đối tượng mắc bệnh ung thư. Bộ kit này cũng có thể bao gồm những thành phần cần thiết để điều chế những hợp chất được dụng, chẳng hạn như chất hòa tan nếu liên hợp trong trạng thái khô lạnh hoặc dạng cô đặc và cho việc áp dụng chế phẩm theo công thức này.

Trừ khi được nêu khác, toàn bộ tài liệu và các đơn sáng chế được trích dẫn trong tài liệu này bằng tham chiếu.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A thể hiện phân tích FACS của liên kết đặc hiệu của những kháng thể kháng CD38 ở chuột đã được tinh chế 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 với các tế bào 300-19 biểu hiện các tế bào lympho Ramos dương tính với CD38 và CD38 ở người.

Fig.1B thể hiện phân tích FACS của liên kết đặc hiệu của các kháng thể kháng CD38 ở chuột đã được tinh chế 38SB30, 38SB31, 38SB39 và kháng thể kháng CD38 AT13/5 đối chứng với các tế bào 300-19 biểu hiện các tế bào lympho Ramos dương tính với CD38 và CD38 ở người.

Fig.2 thể hiện những đường cong xác định chuẩn độ liên kết của 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 được thiết lập với các tế bào Ramos.

Fig.3 thể hiện những biểu đồ điểm (nhuộm màu FL4-H; TO-PRO-3; trực y và FL1-H; nhuộm màu Annexin V-FITC; trực x) của các tế bào Ramos trải qua cơ chế gây chết tế bào theo chương trình sau khi ủ với 38SB13, 38SB19, hoặc AT13/5 (10 nM) trong 24 giờ.

Fig.4A thể hiện phần trăm trung bình của các tế bào Ramos trải qua cơ chế gây chết tế bào theo chương trình sau khi ủ trong 24 giờ với 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, 38SB39, 38SB7, 38SB23, IB4, AT13/5, OKT10, hoặc SUN-4B7. Phần trăm trung bình của các tế bào dương tính V với Annexin (trục y; bao gồm cả hai tế bào dương tính và âm tính với TO-PRO-3) từ những mẫu nhân bản được vẽ sơ đồ.

Fig.4B thể hiện phần trăm trung bình của các tế bào Daudi trải qua cơ chế gây chết tế bào theo chương trình sau khi ủ trong 24 giờ với bộ kháng thể tương tự như trong hình 4A.

Fig.4C thể hiện phần trăm trung bình của các tế bào Molp-8 trải qua cơ chế gây chết tế bào theo chương trình sau khi ủ trong 24 giờ với bộ kháng thể tương tự trong hình 4A.

Fig.5A thể hiện biểu đồ vật truyền biểu hiện ở người được dùng để biểu hiện hu38SB19- LC.

Fig.5B thể hiện biểu đồ vật truyền biểu hiện ở người được dùng để biểu hiện hu38SB19- HC.

Fig.5C thể hiện biểu đồ vật truyền biểu hiện ở người được dùng để biểu hiện cả hu38SB19LC và hu38SB19HC.

Fig.6A thể hiện các hoạt tính ADCC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB13, ch38SB18, và ch38SB19, đối với các tế bào Ramos.

Fig.6B thể hiện các hoạt tính ADCC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB30, ch38SB31 và ch38SB39 đối với các tế bào Ramos.

Fig.7A thể hiện các hoạt tính được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB18, ch38SB19, ch38SB31, và IgGI không liên kết dạng khảm ở người kiểm soát kháng thể đối với các tế bào u đa tủy LP-1.

Fig.7B so sánh các hoạt tính ADCC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB19 và 38SB19 ở chuột đối với các tế bào Daudi.

Fig.8A thể hiện các hoạt tính ADCC được làm trung gian bởi kháng thể ch38SB19 và bởi IgGI không liên kết dạng khảm ở kháng thể đối chứng đối với các tế bào NALM-6 B-ALL.

Fig.8B thể hiện các hoạt tính ADCC được làm trung gian bởi kháng thể ch38SB19 và IgGI không liên kết dạng khảm ở kháng thể đối chứng đối với các tế bào MOLT-4 T-ALL.

Fig.9A thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, và ch38SB39 đối với các tế bào Raji-IMG

Hình 9B thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB19 và ch38SB31 đối với các tế bào Raji-IMG

Fig.10 thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB18, ch38SB19, ch38SB31 và IgGI không liên kết dạng khảm ở kháng thể đối chứng đối với các tế bào viêm đa tủy LP-1.

Fig.11A thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB13, ch38SB19, và ch38SB39 đối với các tế bào Daudi.

Fig.11B thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB18 và ch38SB30 đối với các tế bào Daudi.

Fig.11C thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB19 và ch38SB31 đối với các tế bào Daudi.

Fig.12A thể hiện các đường xác định độ chuẩn liên kết của ch38SB19, hu38SB19 v1.00, và hu38SB19 v1.20 đối với việc liên kết với các tế bào Ramos.

Fig.12B thể hiện các đường liên kết so sánh ch38SB19, hu38SB19 v1.00, và hu38SB19 v1.00 về khả năng của chúng với liên kết của kháng thể 38SB19 ở loài chuột với các tế bào Ramos.

Fig.13 thể hiện phần trăm trung bình của các tế bào Daudi trải qua cơ chế gây chết tế bào theo chương trình sau 24 giờ ủ với kháng thể ch38SB19, hu38SB19 v1.00, hoặc hu38SB19 v1.20

Fig.14 thể hiện các hoạt tính ADCC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB19, hu38SB19 v1.00, hu38SB19 v1.20 và bằng IgGI không liên kết dạng khảm kháng thể đối chứng đối với các tế bào viêm đa tủy LP-1.

Fig.15A thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB19, hu38SB19 v100, và hu38SB19 v1.20 đối với các tế bào lympho Raji-IMG.

Fig.15B thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB19, hu38SB19 v1.00, và hu38SB19 v1.20 đối với các tế bào viêm đa tủy LP-1.

Fig.15C thể hiện các hoạt tính CDC được làm trung gian bởi các kháng thể ch38SB19, hu38SB19 v100, và hu38SB19 v1.20 đối với các tế bào gây bệnh bạch cầu thể lympho cấp tính.

Fig.16 thể hiện phần trăm trung bình của các tế bào dương tính với Annexin V sau 24 giờ ủ với kháng thể hu38SB19 v100 đối với các tế bào lympho của tế bào B SU-DHL-8 lan tỏa lớn, các tế bào lympho NU-DUL-1 của tế bào B, các tế bào gây bệnh bạch cầu thể lympho cấp tính DND-41 của tế bào T, các tế bào gây bệnh bạch cầu thể lympho mãn tính JVM-13 của tế bào B và các tế bào gây bệnh bạch cầu ở tế bào tóc HC-1.

Fig.17 thể hiện phần trăm sống sót của các con chuột bị nhiễm khối u ác tính Ramos ở người đã phân tán được tạo ra. Những con chuột này được điều trị bằng kháng thể 8SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 hoặc PBS như đã được chỉ ra.

Fig.18 thể hiện phần trăm sống sót của những con chuột SCID bị nhiễm các khối u ác tính Daudi ở người đã phân tán được tạo ra. Những con chuột này được điều trị bằng kháng thể hu38SB19 hoặc mu38SB19 hoặc PBS như đã được chỉ ra.

Fig.19 thể hiện số lượng khối u ác tính trung bình ở các con chuột SCID bị nhiễm các khối u ác tính ghép ngoại lai gây viêm đa tủy. những con chuột này được điều trị bằng hu38SB19, kháng thể IgGI đối chứng không liên kết hoặc PBS như đã được chỉ ra.

Fig.20 thể hiện số lượng khối u ác tính trung bình ở những con chuột SCID bị nhiễm khối u ác tính ghép ngoại lai gây bệnh viêm đa tủy MOLP-8. Những con chuột này được điều trị bằng hu38SB19, mu38SB19, kháng thể IgGI đối chứng không liên kết hoặc PBS như đã được chỉ ra.

Mô tả chi tiết sáng chế

Những kháng thể mới có khả năng liên kết đặc hiệu với CD38 được đề cập trong tài liệu này. Đặc biệt, các tác giả sáng chế đã khám phá ra các kháng thể mới liên kết đặc hiệu với CD38 trên bề mặt tế bào và làm chết các tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình. Theo một khía cạnh của sáng chế, các kháng thể kháng CD38 cũng có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Theo khía cạnh khác, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết tế bào CD38⁺ bằng các cơ chế gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC). Cũng theo khía cạnh khác, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết tế bào CD38⁺ bằng ít nhất hai trong số những cơ chế được nêu trên, cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC, và CDC. Đặc biệt, theo phương án được ưu tiên, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC và CDC. Sáng chế do đó đề cập đến các kháng thể kháng CD38 đầu tiên có khả năng làm chết tế bào CD38⁺ bằng 3 cơ chế khác nhau.

Các kháng thể có khả năng liên kết CD38 và gây chết tế bào bằng cơ chế gây chết tế bào ở các tế bào CD38⁺ đã được mô tả trước đây (M. Kumagai et al., 1995, J Exp Med, 181: 1101-1110; E. Todisco et al. 2000, Blood, 95: 535-542), tuy nhiên các kháng thể theo sáng chế là kháng thể đầu tiên mà hoạt động làm chết tế bào trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc xytokin dẫn xuất từ tế bào nền được áp dụng. Thuật ngữ “chất nền” được dùng ở đây chỉ các mô hỗ trợ lành tính của khối u bao gồm mô liên kết, các mạch máu, và các tế bào dễ bị viêm. Các tế bào nền tạo ra các yếu tố phát triển và các chất khác, bao gồm xytokin, có thể ảnh hưởng đến trạng thái của các tế bào ung thư. Thuật ngữ “xytokin” được dùng ở đây chỉ các protein được tiết ra ít (ví dụ như IL-1, IL-2, IL-4, IL-5, và IL-6, IFNg, IL-3, IL-7 và GM-CSF) làm trung gian và điều chỉnh khả năng miễn dịch, tính dễ viêm nhiễm và khả năng sinh huyết. Các tác giả đã chỉ ra ở đây rằng các kháng thể của tình trạng kỹ thuật trước là không thể làm chết tế bào bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế

bào nền. Trái lại, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế hiển thị trong cùng điều kiện các hoạt tính gây chết tế bào mạnh.

Theo khía cạnh khác, những kháng thể theo sáng chế có khả năng liên kết protein CD38 với K_D 3×10^{-9} M hoặc nhỏ hơn.

Thuật ngữ “CD38” được dùng ở đây chỉ loại protein xuyên màng loại II bao gồm, ví dụ như trình tự axit amin như trong đăng ký tại ngân hàng gen số NP_001766. “Tế bào CD38⁺” là tế bào biểu hiện protein CD38. Tốt hơn là tế bào CD38⁺ là tế bào ở động vật có vú.

Theo một khía cạnh của sáng chế, tế bào CD38⁺ là tế bào ác tính. Theo khía cạnh khác, tế bào CD38⁺ là tế bào B. Theo khía cạnh được ưu tiên, tế bào CD38⁺ là tế bào ung thư có nguồn gốc từ khối u ác tính sinh huyết. Theo khía cạnh được ưu tiên hơn, tế bào CD38⁺ là tế bào lympho, tế bào gây bệnh bạch cầu, hoặc tế bào gây bệnh u đa tủy. Theo khía cạnh được ưu tiên khác nữa, tế bào CD38⁺ là tế bào NHL₁ BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL, hoặc CML.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng CD38 có khả năng làm chết ít nhất 24% các tế bào lympho Daudi trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền. Theo phương án khác, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết ít nhất 7% các tế bào lympho Ramos trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền. Theo phương án khác nữa, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết ít nhất 11% các tế bào gây u đa tủy MOLP-8 trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền.

Theo phương án khác, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết ít nhất 36% tế bào lympho SU-DHL-8 trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền. Theo phương án khác, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết ít nhất 27% các tế bào lympho NU-DUL-1 trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền. Theo phương án khác nữa, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết ít nhất 62% các tế bào bạch cầu DND-41 trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền.

Theo phương án khác, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết ít nhất 9% các tế bào bạch cầu JVM-13 trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền. Theo phương án khác nữa, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế có khả năng làm chết ít nhất 4% các tế bào bạch cầu HC-1 trong trường hợp không có các tế bào nền hoặc xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền.

Các kháng thể

Thuật ngữ “kháng thể” được dùng ở đây theo nghĩa rộng nhất và cụ thể là bao gồm các kháng thể đơn dòng (bao gồm các kháng thể đơn dòng có chiều dài đầy đủ) thuộc isotyp bất kỳ chẳng hạn như IgG, IgM, IgA, IgD và IgE, các kháng thể đa dòng, các kháng thể đa loài, các kháng thể khảm và các đoạn kháng thể. Kháng thể hoạt tính với kháng nguyên đặc hiệu có thể được tạo ra bằng phương pháp tái tổ hợp chẳng hạn như việc chọn các thư viện của các kháng thể tái tổ hợp trong thể thực khuẩn hoặc các vật truyền tương tự, hoặc bằng việc gây miễn dịch cho động vật bằng kháng nguyên hoặc axit nucleic mã hóa kháng nguyên.

Kháng thể IgG điển hình bao gồm hai chuỗi nặng giống nhau và hai chuỗi nhẹ giống nhau được liên kết với nhau bằng liên kết disulfua. Mỗi chuỗi nặng và nhẹ chứa vùng cố định và vùng biến đổi. Mỗi vùng biến đổi bao gồm ba phân đoạn được gọi là “những vùng quyết định tính bổ sung” (“CDR”) hoặc “vùng siêu biến” chịu trách nhiệm chính là liên kết epitop của kháng nguyên. Chúng thường được ưu tiên đối với CDR1, CDR2 và CDR3, được đánh số theo thứ tự từ đầu N. Những phần được bảo toàn cao hơn của các vùng biến đổi được gọi là “vùng khung”.

Như được sử dụng ở đây “V_H” hoặc “VH” chỉ vùng biến đổi của chuỗi nặng globulin miễn dịch của kháng thể, bao gồm chuỗi nặng của đoạn Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' hoặc F(ab')₂. “V_L” hoặc “VL” chỉ vùng biến đổi của chuỗi nhẹ globulin của kháng thể bao gồm chuỗi nhẹ của đoạn Fv, scFv, dsFv, Fab, Fab' hoặc F(ab')₂.

“Kháng thể đa dòng” là kháng thể được tạo ra ở giữa hoặc với sự có mặt của một hoặc nhiều những kháng thể không giống nhau khác. Nhìn chung, các kháng thể đa dòng được tạo ra từ lympho B với sự có mặt của một vài lympho B tạo ra các

kháng thể không giống nhau. Thông thường, các kháng thể đa dòng thu được trực tiếp từ động vật được miễn dịch.

“Kháng thể đơn dòng” được dùng ở đây là kháng thể thu được từ quần thể các kháng thể về bản chất là đồng nhất với nhau, tức là các kháng thể tạo thành quần thể này về cơ bản là giống hệt nhau ngoại trừ những đột biến tự nhiên có thể xuất hiện với lượng nhỏ. Những kháng thể này được chỉ định chống lại epitop đơn và do đó có tính đặc hiệu cao.

“Epitop” là mặt của kháng nguyên mà kháng thể liên kết. Nếu kháng nguyên là polyme, chẳng hạn như protein hoặc polysaccarit, epitop có thể được tạo ra bằng các chất dư lân cận hoặc không lân cận được đưa vào trạng thái gần nhau bằng cách cuộn gập polyme kháng nguyên. Trong các protein, epitop được tạo lên bằng các axit amin liền nhau thường được giữ lại khi tiếp xúc với dung môi biến tính trong khi đó các epitop được tạo thành bằng các axit amin không lân cận thường bị mất trong quá trình tiếp xúc trên.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ " K_D " chỉ hằng số phân ly của một tương tác kháng thể/kháng nguyên cụ thể.

Sáng chế thu được những kháng thể kháng CD38 mới ở loài chuột, ở đây là 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 có đầy đủ những đặc tính tương ứng với các trình tự axit amin của cả hai chuỗi nặng và nhẹ, sự đồng nhất các CDR, việc đồng nhất các axit amin bề mặt, và các cách biểu hiện của chúng ở dạng tái tổ hợp. Axit amin bậc một và các trình tự ADN của các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 chuỗi nặng và nhẹ và các phiên bản được nhân hóa được đề cập ở đây.

Các dòng tế bào hybridoma tạo ra các kháng thể kháng CD38 ở loài chuột 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 đã được nêu ở American Type Culture Collection (10801 University Bid, Manassas, VA, 20110-2209, USA), 21/6/2006, số đăng ký lần lượt là PTA-7667, PTA-7669, PTA-7670, PTA-7666, PTA-7668, và PTA-7671.

Phạm vi đề cập của sáng chế không giới hạn ở các kháng thể hoặc các đoạn bao gồm những trình tự này. Thay vào đó, toàn bộ kháng thể và các đoạn này liên kết

đặc hiệu với CD38 và có khả năng làm chết tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC và/hoặc CDC, nằm trong phạm vi của sáng chế này. Do đó, các kháng thể và các đoạn kháng thể có thể khác so với các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 hoặc các dẫn xuất được nhân hóa trong các trình tự axit amin của giàn của chúng, các CDR chuỗi nhẹ và chuỗi nặng vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến các kháng thể hoặc các đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm một hoặc nhiều CDR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, và 36. Theo phương án được ưu tiên, các kháng thể của sáng chế bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, và chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 31, 32, và 33, và chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 34, 35, và 36.

Theo phương án được ưu tiên khác, các kháng thể của sáng chế bao gồm ba CDR có các trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, và 6. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB13 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ, và chuỗi nặng gồm ba CDR liên tiếp có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 1, 2, và 3, chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 4, 5, và 6.

Theo phương án được ưu tiên khác, các kháng thể của sáng chế bao gồm ba CDR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 7, 8, 9, 10, 11, và 12. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB18 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 7, 8, và 9, và chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 10, 11, và 12.

Theo phương án được ưu tiên khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm ba CDR có các trình tự axit amin được chọn từ nhóm của SEQ ID NO: 13, 14, 15, 16, 17, và 18. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB19 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 13, 14, và 15, và chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 16, 17, và 18.

Theo phương án được ưu tiên khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm ba CDR có các trình tự axit amin được chọn từ nhóm của SEQ ID NO: 19, 20, 21, 22, 23, 24. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB30 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, và chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 19, 20, và 21, và chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 22, 23, và 24.

Theo phương án được ưu tiên khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm ba CDR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 25, 26, 27, 28, 29, và 30. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB31 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, chuỗi nặng nêu trên bao gồm ít nhất ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 25, 26, và 27, và chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 28, 29, và 30.

Theo phương án được ưu tiên khác nữa, các kháng thể theo sáng chế bao gồm ba CDR có các trình tự axit amin được chọn từ nhóm 31, 32, 33, 34, 35, và 36. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB39 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, và chuỗi nặng nêu trên chứa ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 31, 32, và 33, và chuỗi nhẹ bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin gồm SEQ ID NO: 34, 35, và 36.

Theo phương án khác, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế bao gồm V_L có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: VL của 38, 40, 42, 44, 46, và 48. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB13 được đề cập bao

gồm V_L có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 38. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB18 được đề cập bao gồm V_L có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 40. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể 38SB19 được đề cập bao gồm V_L có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 42. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể 38SB30 được đề cập bao gồm V_L có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 44. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB31 được đề cập bao gồm V_L có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 46. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB39 được đề cập bao gồm V_L có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 48.

Theo phương án khác, các kháng thể theo sáng chế bao gồm V_H có trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 50, 52, 54, 56, 58, và 60. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB13 được đề cập bao gồm V_H có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 50. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB18 được đề cập bao gồm V_H có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 52.

Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB19 được đề cập bao gồm V_H có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 54. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB30 bao gồm V_H có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 56. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB31 bao gồm V_H có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 58. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể 38SB39 bao gồm V_H có trình tự axit amin bao gồm SEQ ID NO: 60.

CÁC KHÁNG THỂ KHẢM VÀ KHÁNG THỂ NHÂN HÓA 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB30

Được sử dụng ở đây, “kháng thể khảm” là kháng thể trong đó vùng cố định hoặc phần tỷ lệ của nó được thay đổi, thay thế hoặc trao đổi, để vùng biến đổi được liên kết với vùng cố định của những loài khác, hoặc thuộc về lớp hoặc phân lớp kháng thể khác. “Kháng thể khảm” cũng chỉ kháng thể mà trong đó vùng biến đổi hoặc phần của nó được thay đổi, thay thế hoặc trao đổi để vùng cố định được liên kết với vùng biến đổi của những loài khác hoặc thuộc về lớp hoặc phân lớp kháng thể

khác. Những phương pháp để tạo ra kháng thể khảm được biết trong tình trạng kỹ thuật. Tham khảo ví dụ Morrison, 1985, Science, 229: 1202; Oi et al., 1986, BioTechniques, 4: 214; Gillies et al., 1989, J. Immunol. Methods, 125: 191-202; Sáng chế Hoa Kỳ số 5,807,715; 4,816,567; và 4,816,397, được đề cập ở đây bằng cách tham khảo chúng một cách tổng thể.

Theo một phương án của sáng chế, các phiên bản dạng khảm 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 được đề cập. Đặc biệt, các phiên bản dạng khảm nêu trên chứa ít nhất một vùng cố định ở người. Theo phương án được ưu tiên khác, vùng cố định ở người này là vùng cố định IgG1/Kappa ở người.

Thuật ngữ “kháng thể nhân hóa”, được sử dụng ở đây, chỉ kháng thể khảm chứa trình tự nhỏ được dẫn xuất từ globulin miễn dịch không phải ở người. Mục đích của quá trình nhân hóa là làm giảm khả năng miễn dịch của kháng thể khác loại, chẳng hạn như kháng thể ở loài chuột, để áp dụng cho người trong khi duy trì liên kết kháng nguyên đầy đủ và đặc tính của kháng thể. Các kháng thể nhân hóa hoặc các kháng thể thích nghi để không loại bỏ bởi động vật có vú khác, có thể được tạo ra bằng việc sử dụng số công nghệ chẳng hạn như tái tạo bề mặt hoặc ghép CDR. Như được sử dụng ở đây, công nghệ tái tạo bề mặt sử dụng liên kết mô hình phân tử, phân tích thống kê và gây đột biến để thay đổi các bề mặt không CDR của những vùng biến đổi kháng thể để làm bề mặt của các kháng thể đã biết của vật đích giống như cũ. Công nghệ ghép CDR liên quan đến việc thay thế những vùng quyết định tính bổ sung của, chẳng hạn như kháng thể ở chuột, vào vùng khung ở người, ví dụ tham khảo WO 92/22653. Các kháng thể khảm nhân hóa tốt hơn là những vùng cố định và những vùng biến đổi khác với những vùng quyết định tính bổ sung (CDR) dẫn xuất thực chất hoặc riêng từ các vùng kháng thể ở người tương ứng và các CDR được dẫn xuất thực chất hoặc riêng từ động vật có vú khác không phải người.

Chiến lược và các phương pháp để tái tạo bề mặt của các kháng thể và những phương pháp khác để giảm khả năng miễn dịch của kháng thể ở những vật chủ khác nhau, được đề cập trong bằng sáng chế US 5,639,641, ở đây được đề cập tính tổng thể của nó bằng tài liệu tham khảo. Một cách ngắn gọn, theo phương pháp được ưu tiên, (1) sắp xếp vị trí của nhiều vùng biến đổi chuỗi kháng thể nhẹ và nặng được tạo

ra để cung cấp tập hợp các vị trí tiếp xúc bề mặt khung của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong đó trong đó sự sắp xếp vị trí cho tất cả vùng biến đổi có độ tương đồng ít nhất là khoảng 98%. (2) tập hợp các gốc axit amin tiếp xúc với bề mặt khung của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định đối với kháng thể của loài gặm nhấm (hoặc đoạn của nó); (3) tập hợp các gốc axit amin tiếp xúc với bề mặt khung của vùng biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng gần như tương đồng với tập hợp các gốc axit amin tiếp xúc với bề mặt của loài gặm nhấm được xác định; (4) tập hợp các gốc axit amin tiếp xúc với bề mặt khung của vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ được xác định trong bước (2) được thể bằng tập hợp các gốc axit amin tiếp xúc với bề mặt khung của vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được xác định ở bước (3), ngoại trừ những gốc axit amin trong 5A của nguyên tử bất kỳ của bất kỳ chất kết tủa của vùng quyết định tính bổ sung của kháng thể của loài gặm nhấm; và (5) kháng thể của loài gặm nhấm được nhân hóa có đặc tính liên kết được tạo ra.

Các kháng thể có thể được nhân hóa bằng việc dùng nhiều kỹ thuật khác bao gồm kỹ thuật ghép CDR (EP 0 239 400; WO 91/09967; bằng sáng chế số U.S. 5,530,101; và 5,585,089), bọc hoặc tái tạo bề mặt (EP 0 592 106; EP 0 519 596; Padlan E. A., 1991, *Molecular Immunology* 28(4/5): 489-498; Studnicka G. M. et al., 1994, *Protein Engineering*, 7(6): 805-814; Roguska MA et al., 1994, *PNAS*, 91: 969-973), đảo chuỗi (bằng sáng chế số U.S. 5,565,332). Các kháng thể ở người có thể được tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết trong tình trạng kỹ thuật bao gồm phương pháp biểu hiện pha. Tham khảo bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,444,887, 4,716,111, 5,545,806, và 5,814,318; và công bố đơn sáng chế quốc tế số WO 98/46645, WO 98/50433, WO 98/24893, WO 98/16654, WO 96/34096, WO 96/33735, và WO 91/10741 (những tài liệu tham khảo nêu trên bằng cách tham khảo chúng một cách tổng thể)

Sáng chế đề cập đến các kháng thể nhân hóa hoặc những đoạn của chúng mà nhận ra CD38 và làm chết tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC, và/hoặc CDC. Theo phương án khác, các kháng thể nhân hóa hoặc các đoạn liên kết epitop của chúng có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ bằng cả 3 cơ chế. Theo phương án khác, các kháng thể nhân hóa hoặc các đoạn liên kết epitop của

chúng theo sáng chế có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình thậm chí là không cần sự có mặt của các tế bào nền hoặc các xytokin được dẫn xuất từ tế bào nền.

Theo phương án được ưu tiên, kháng thể nhân hóa như vậy là kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 hoặc đoạn liên kết epitop của chúng.

Theo phương án được ưu tiên, phiên bản nhân hóa hoặc được tái tạo bề mặt của các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 trong đó dư lượng tiếp xúc bề mặt của kháng thể hoặc các đoạn của chúng được thể trong cả hai chuỗi nặng và nhẹ để làm cho các bề mặt kháng thể ở người giống hơn.

Các kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 hoặc các đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế có những đặc tính được cải thiện. Ví dụ, các kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 hoặc các đoạn liên kết epitop của chúng đặc biệt nhận ra protein CD38. Tốt hơn nữa là, các kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 hoặc các đoạn liên kết epitop của chúng có thêm khả năng làm chết tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC và/hoặc CDC.

Những phiên bản nhân hóa của các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 cũng có đầy đủ những đặc tính tương ứng với các trình tự axit amin tương ứng của chúng của cả vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ, các trình tự ADN của những gen đối với các vùng biến đổi chuỗi nặng và nhẹ, sự đồng nhất các CDR, sự đồng nhất các axit amin bề mặt của chúng, và thể hiện các phương pháp để biểu hiện chúng ở dạng tái tổ hợp. Tuy nhiên, phạm vi của sáng chế không giới hạn ở các kháng thể và những đoạn bao gồm những trình tự này. Thay vào đó, toàn bộ kháng thể và các đoạn liên kết đặc hiệu với CD38 và có khả năng làm chết các tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC và/hoặc CDC thuộc phạm vi của sáng chế này. Tốt hơn là, các kháng thể này có khả năng làm chết tế bào CD38⁺ bằng tất cả ba cơ chế. Do đó, các kháng thể và các đoạn kháng thể liên kết epitop theo sáng chế có thể khác với các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19,

38SB30, 38SB31, và 38SB39 hoặc các dẫn xuất được nhân hóa của chúng, trong các trình tự axit amin của giá đỡ của chúng, CDR và/hoặc chuỗi nhẹ và chuỗi nặng và vẫn nằm trong phạm vi của sáng chế.

Các CDR của các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 được xác định bằng cách mô hình hóa và những cấu trúc phân tử của chúng đã được dự đoán. Mặt khác, trong khi các CDR là quan trọng cho việc nhận ra epitop, chúng không cần thiết đối với các kháng thể và các đoạn theo sáng chế. Theo đó, những kháng thể và đoạn được đề cập có những đặc tính đã được cải thiện được tạo ra bằng, ví dụ, đột biến cấu trúc của kháng thể theo sáng chế.

Các trình tự của những vùng biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 và các trình tự CDR trước đây chưa được biết đến và được nêu ra trong đơn này. Những thông tin như vậy có thể được sử dụng để tạo ra các phiên bản được nhân hóa của các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39. Những kháng thể kháng CD38 được nhân hóa hoặc những dẫn xuất của chúng cũng có thể được sử dụng như chất liên kết tế bào của sáng chế.

Do đó, theo một phương án, sáng chế đề cập đến các kháng thể nhân hóa hoặc đoạn liên kết epitop của chúng bao gồm một hoặc nhiều CDR có trình tự axit amin được chọn từ nhóm chứa SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, và 36. Theo phương án được ưu tiên, các kháng thể nhân hóa theo sáng chế bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ và chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 1, 2, 3, 7, 8, 9, 13, 14, 15, 19, 20, 21, 25, 26, 27, 31, 32, và 33, và chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba CDR liên tiếp có các trình tự axit amin được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NOS: 4, 5, 6, 10, 11, 12, 16, 17, 18, 22, 23, 24, 28, 29, 30, 34, 35, và 36. Theo phương án được ưu tiên khác, phiên bản được nhân hóa của 38SB13 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 1, 2 và 3, và trong đó chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba vùng quyết định

tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 4, 5, và 6. Theo phương án được ưu tiên khác, phiên bản được nhân hóa 38SB18 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 7, 8, và 9, và trong đó chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 10, 11, và 12. Theo phương án được ưu tiên khác, phiên bản được nhân hóa 38SB19 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 13, 14, và 15, và trong đó chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 16, 17 và 18. Theo phương án được ưu tiên khác, phiên bản được nhân hóa 38SB30 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 19, 20 và 21 và trong đó chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 22, 23, và 24. Theo phương án được ưu tiên khác, phiên bản được nhân hóa 38SB31 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 25, 26, và 27, và trong đó chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 28, 29 và 30. Theo phương án được ưu tiên khác, phiên bản được nhân hóa 38SB39 được đề cập bao gồm ít nhất một chuỗi nặng và ít nhất một chuỗi nhẹ, trong đó chuỗi nặng nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 31, 32, và 33, và trong đó chuỗi nhẹ nêu trên bao gồm ba vùng quyết định tính bổ sung liên tiếp có các trình tự axit amin được thể hiện bằng SEQ ID NO: 34, 35 và 36.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa hoặc đoạn của chúng bao gồm V_H có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 66 và 72.

Theo phương án được ưu tiên, kháng thể nhân hóa 38SB19 được đề cập bao gồm V_H có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 66. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể nhân hóa 38SB31 được đề cập bao gồm V_H có trình tự axit amin được thể hiện bởi SEQ ID NO: 72.

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể nhân hóa hoặc đoạn của chúng bao gồm V_L có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 62, 64, 68, và 70. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể nhân hóa 38SB19 được đề cập bao gồm V_L có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 62 và 64. Theo phương án được ưu tiên khác, kháng thể nhân hóa 38SB31 được đề cập bao gồm V_L có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 68 và 70.

Các kháng thể nhân hóa 38SB19 và các đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế cũng có thể bao gồm những nhóm thể trong dư lượng axit amin của chuỗi nặng hoặc/và nhẹ tại một hoặc nhiều vị trí được xác định bằng phần màu xám trong bảng 1A và 1B biểu hiện phần khung bề mặt ở loài chuột mà đã được thay đổi từ phần ở chuột gốc tới phần bề mặt khung tương ứng trong kháng thể ở người, 28E4.

Phần sao (*) trong bảng 1B tương ứng với những đột biến riêng biệt ở chuột trong biến thể chuỗi nặng 38SB19 được nhân hóa (SEQ ID NO: 65). Những phần đột biến riêng biệt ở chuột gần với của CDR và được chọn như được mô tả trong bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,639,641 hoặc giống với việc lựa chọn các phần mà trong những nỗ lực nhân hóa trước đây đã làm giảm ái lực liên kết kháng nguyên (Roguska et al., 1996, công bố đơn xin cấp bằng sáng chế Hoa Kỳ 2003/0235582 và 2005/0118183).

Tương tự, những kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 và các đoạn liên kết epitop của chúng theo sáng chế cũng có thể bao gồm nhóm thể trong các dư lượng axit amin của chuỗi nặng và/hoặc nhẹ.

CÁC POLYNUCLEOTIT, VẬT TRUYỀN và CÁC TẾ BÀO CHỦ.

Các axit nucleic mã hóa các kháng thể kháng CD38 của sáng chế được đề cập. Theo một phương án, phân tử axit nucleic mã hoá chuỗi nhẹ và/hoặc nặng của globulin miễn dịch kháng CD38. Theo phương án được ưu tiên, axit nucleic đơn mã

hóa chuỗi nặng của globulin miễn dịch kháng CD38 và phân tử axit nucleic khác mã hoá chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch kháng CD38.

Theo khía cạnh khác của sáng chế, các polynucleotit mã hóa các polypeptit được đề cập có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 21, 22, 23, 24, 25, 26, 27, 28, 29, 30, 31, 32, 33, 34, 35, 36, 38, 40, 42, 44, 46, 48, 50, 52, 54, 56, 58, 60, 62, 64, 66, 68, 70, và 72. Theo phương án được ưu tiên, polynucleotit theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NO: 37, 39, 41, 43, 45, 47, 49, 51, 53, 55, 57, 59, 61, 63, 65, 67, 69, và 71. Sáng chế không giới hạn đối với các polynucleotit nêu trên về thực chất tuy nhiên cũng bao gồm toàn bộ các polynucleotit biểu hiện độ tương đồng ít nhất là 80% so với các polynucleotit nêu trên.

Sáng chế đề cập đến các vật truyền chứa các polynucleotit theo sáng chế. Theo một phương án, vật truyền chứa polynucleotit mã hóa chuỗi nặng của globulin miễn dịch kháng CD38. Theo phương án khác, polynucleotit mã hóa chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch kháng CD38. Sáng chế cũng đề cập đến các vật truyền chứa các phân tử polynucleotit mã hóa, hợp nhất protein, các kháng thể đã được điều chỉnh, các đoạn kháng thể và các mẫu thử của chúng.

Để biểu hiện chuỗi nặng và/hoặc nhẹ của các kháng thể kháng D38 theo sáng chế, các polynucleotit mã hóa các chuỗi nặng và/hoặc nhẹ được đưa vào trong vật truyền biểu hiện sao cho các gen được liên kết hoạt động với các trình tự phiên mã và dịch mã. Các vật truyền biểu hiện bao gồm các plasmid, YAC, cosmit, virus retro, thể bổ sung (episome) dẫn xuất từ EBV, và toàn bộ những vật truyền khác mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ biết là thuận tiện để đảm bảo việc biểu hiện của các chuỗi nặng và/hoặc nhẹ trên. Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ nhận ra rằng các polynucleotit mã hóa các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được vô tính thành những vật truyền khác nhau hoặc trong cùng vật truyền. Theo phương án được ưu tiên, các polynucleotit nêu trên được vô tính trong cùng vật truyền.

Các polynucleotit theo sáng chế và các vật truyền bao gồm những phân tử này có thể được sử dụng để vận chuyển tế bào chủ ở động vật có vú thích hợp. Việc vận chuyển này có thể bằng bất kỳ phương pháp đã biết nào để đưa các polynucleotit vào

trong tế bào chủ. Những phương pháp này được biết đến bởi những người hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và bao gồm việc vận chuyển qua trung gian dextran, kết tủa canxi phosphat, sự chuyển nhiễm qua trung gian polybren, phản ứng tổng hợp protoplast, điện hoá, bao nang các polynucleotit vào các liposom, tiêm lưỡng chất và tiêm vi lượng trực tiếp ADN vào nhân.

CÁC ĐOẠN KHÁNG THỂ

Các kháng thể theo sáng chế bao gồm cả các kháng thể có chiều dài đầy đủ được thảo luận ở trên, cũng như các đoạn liên kết epitop của chúng. Được sử dụng ở đây, “các đoạn kháng thể” bao gồm bất kỳ phần nào của kháng thể mà giữ lại khả năng liên kết với epitop được nhận ra bởi kháng thể có chiều dài đầy đủ, nhìn chung được gọi là “các đoạn liên kết epitop”.

Những ví dụ về các đoạn kháng thể bao gồm, tuy nhiên không giới hạn với, Fab, Fab' và F(ab')₂, Fd, chuỗi đơn Fvs (scFv), các kháng thể chuỗi đơn, liên kết disulfua Fvs (dsFv) và các đoạn bao gồm hoặc vùng VL hoặc vùng VH. Các đoạn liên kết epitop bao gồm các kháng thể chuỗi đơn, có thể bao gồm riêng (những) vùng biến đổi hoặc kết hợp với toàn bộ hoặc một phần của những vùng sau: vùng bản lề, miền CH1, CH2, và CH3.

Những đoạn như vậy có thể bao gồm một hoặc cả hai đoạn Fab hoặc đoạn F(ab')₂. Tốt hơn là, các đoạn kháng thể chứa toàn bộ sáu CDR của toàn bộ kháng thể, mặc dù những đoạn này chứa ít hơn toàn bộ những vùng như vậy, chẳng hạn như ba, bốn hoặc năm CDR cũng có chức năng như vậy. Ngoài ra, các đoạn có thể hoặc có thể kết hợp các cạnh của bất kỳ một trong số các nhóm globulin miễn dịch nào sau đây: IgG, IgM, IgA, IgD, hoặc IgE, và các phân lớp của chúng.

Những đoạn Fab và F(ab')₂ có thể được tạo ra bằng cách tách protein phân , sử dụng enzym chẳng hạn như papain (các đoạn Fab) hoặc pepsin (các đoạn F(ab')₂).

Những đoạn “FVs chuỗi” (“scFvs”) là những đoạn liên kết epitop chứa ít nhất một đoạn của vùng biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (V_H) được liên kết với ít nhất một đoạn của vùng biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (V_L). Liên kết có thể là liên kết linh hoạt, ngăn được lựa chọn để đảm bảo rằng sự gấp nếp ba chiều riêng của những vùng V_L và V_H diễn ra một khi chúng được liên kết để duy trì những đặc tính liên kết

phân tử đích của toàn bộ kháng thể, từ đó đoạn kháng thể chuỗi đơn được dẫn xuất ra. Đầu carboxyl của trình tự V_L hoặc V_H có thể được liên kết cộng hóa trị bằng trình liên kết với đầu axit amin của trình tự V_L hoặc V_H bổ sung.

Những đoạn kháng thể chuỗi đơn theo sáng chế chứa những trình tự axit amin có ít nhất một trong số những vùng biến đổi hoặc vùng quyết định tính bổ sung (CDR) của toàn bộ kháng thể được mô tả trong bản mô tả này, tuy nhiên thiếu một vài hoặc toàn bộ miền cố định của những kháng thể đó. Những miền cố định này không cần thiết cho việc liên kết kháng nguyên, tuy nhiên lại tạo ra phần chính cho cấu trúc của toàn bộ kháng thể. Những đoạn kháng thể chuỗi đơn có thể vì thế mà sẽ khắc phục được một số vấn đề liên quan đến việc sử dụng các kháng thể chứa một phần hoặc toàn bộ miền cố định. Ví dụ, những đoạn kháng thể chuỗi đơn có xu hướng tách những phản ứng không mong muốn giữa các phân tử sinh học và vùng cố định chuỗi nặng hoặc những hoạt tính sinh học không mong muốn khác. Ngoài ra, các đoạn kháng thể chuỗi đơn nhỏ hơn đáng kể so với toàn bộ kháng thể và vì thế có thể có độ thấm nước mao mạch lớn hơn so với toàn bộ kháng thể, cho phép những đoạn kháng thể chuỗi đơn xác định và liên kết những vùng liên kết kháng nguyên đích hiệu quả hơn. Những đoạn kháng thể này cũng có thể được tạo ra trên quy mô tương đối lớn trong các tế bào nhân rải rác, do đó tạo thuận lợi cho việc tạo ra chúng.

Hơn nữa, kích thước tương đối nhỏ của các đoạn kháng thể chuỗi đơn khiến chúng ít có khả năng gây ra những phản ứng miễn dịch ở người nhận hơn là toàn bộ kháng thể.

Các đoạn kháng thể chuỗi đơn có thể được tạo ra bằng sự nhân dòng phân tử, thư viện biểu thị thể thực khuẩn của kháng thể hoặc những kỹ thuật tương tự được biết đến đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Những protein này có thể được tạo ra, ví dụ trong các tế bào nhân chuỗi hoặc các tế bào nhân rải rác bao gồm các vi khuẩn. Các đoạn liên kết epitop theo sáng chế cũng có thể được tạo ra bằng việc sử dụng những phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn khác nhau đã biết trong tình trạng kỹ thuật. Trong những phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, những miền kháng thể chức năng được thể hiện trên bề mặt thể thực khuẩn mang những trình tự polynucleotit mã hóa chúng. Cụ thể, những thể thực khuẩn như vậy có thể

được sử dụng để biểu hiện những vùng liên kết epitop được nêu rõ trong thư mục hoặc thư viện kháng thể tổ hợp (ví dụ ở người hoặc ở loài chuột). Thể thực khuẩn biểu hiện miền liên kết epitop liên kết kháng nguyên chung có thể được chọn hoặc được xác nhận bởi kháng nguyên, ví dụ như sử dụng kháng nguyên được liên kết hoặc giữ trên bề mặt rắn hoặc chuỗi hạt. Thể thực khuẩn được sử dụng trong những phương pháp này là những thể thực khuẩn dạng sợi điển hình bao gồm những miền liên kết fd và M13 được biểu hiện rõ từ những thể thực khuẩn Fab, Fv hoặc các miền kháng thể Fv disulfua được làm ổn định được liên kết tái tổ hợp với hoặc thể thực khuẩn của gen III hoặc protein của gen VIII.

Những ví dụ về những phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn có thể được sử dụng để tạo ra các đoạn liên kết epitop theo sáng chế bao gồm những phương pháp được đề cập trong Brinkman et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, 182: 41-50; Ames et al., 1995, *J. Immunol. Methods*, 184: 177-186; Kettleborough et al., 1994, *Eur. J. Immunol.*, 24: 952-958; Persic et al., 1997, *Gene*, 187: 9-18; Burton et al., 1994, *Advances in Immunology*, 57: 191-280; WO/1992/001047; WO 90/02809; WO 91/10737; WO 92/01047; WO 92/18619; WO93/11236; WO 95/15982; WO 95/20401; và Bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,698,426; 5,223,409; 5,403,484; 5,580,717; 5,427,908; 5,750,753; 5,821,047; 5,571,698; 5,427,908; 5,516,637; 5,780,225; 5,658,727; 5,733,743 và 5,969,108; mỗi phương pháp trong đó được đề cập ở đây bằng cách tham khảo tài liệu một cách tổng thể.

Sau khi lựa chọn thể thực khuẩn, các vùng của thể thực khuẩn mã hóa các đoạn có thể được phân lập và được sử dụng để tạo ra các đoạn liên kết epitop thông qua việc biểu hiện trong vật chủ được chọn, bao gồm những tế bào ở động vật có vú, tế bào vi khuẩn, tế bào thực vật, men và vi khuẩn, sử dụng công nghệ ADN tái tổ hợp, ví dụ như được mô tả chi tiết dưới đây. Ví dụ các công nghệ để tạo ra tái tổ hợp các đoạn Fab, Fab' và F(ab')₂ cũng có thể được sử dụng bằng việc dùng phương pháp đã được biết đến trong tình trạng kỹ thuật chẳng hạn như được bộc lộ trong WO 92/22324; Mullinax et al., 1992, *BioTechniques*, 12(6): 864-869; Sawai et al., 1995, *AJRI*, 34: 26- 34; và Better et al., 1988, *Science*, 240:1041-1043; Những tài liệu nêu trên được đề cập ở đây bằng tham chiếu tổng thể. Những ví dụ về kỹ thuật có thể

được sử dụng để tạo ra các kháng thể và Fvs chuỗi đơn bao gồm những phương pháp được đề cập trong bằng sáng chế Ho Kỳ số 4,946,778 và 5,258,498; Huston et al., 1991, *Methods in Enzymology*, 203: 46-88; Shu et al., 1993, *PNAS*, 90: 7995-7999; Skerra et al., 1988, *Science*, 240:1038-1040.

NHỮNG ĐƯƠNG LƯỢNG VỀ MẶT CHỨC NĂNG

Cũng được đưa vào trong phạm vi của sáng chế là những đương lượng về mặt chức năng của kháng thể kháng CD38 và kháng thể của thụ thể kháng CD38 được nhân hóa. Thuật ngữ “đương lượng về mặt chức năng” bao gồm các kháng thể có trình tự tương đồng, các kháng thể khảm, kháng thể nhân hóa và kháng thể đã được điều chỉnh, ví dụ, trong đó mỗi đương lượng về mặt chức năng được xác định bằng khả năng liên kết của nó với protein CD38. Những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng có sự chồng chéo trong nhóm phân tử được gọi là “các đoạn kháng thể” và nhóm được gọi là “đương lượng về mặt chức năng”. Các phương pháp tạo ra đương lượng về mặt chức năng được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực và được đề cập, ví dụ, trong WO 93/21319, EP 239,400; WO 89/09622; EP 338,745; và EP 332,424, mà được đề cập hoàn toàn tương ứng bằng tham chiếu.

Những kháng thể có trình tự tương đồng là những kháng thể có các trình tự axit amin mà có trình tự tương tự với trình tự axit amin của kháng thể kháng CD38 và kháng thể kháng CD38 được nhân hóa theo sáng chế. Tính tương đồng tốt hơn là với trình tự axit amin của các vùng biến đổi của kháng thể kháng CD38 và kháng thể kháng CD38 được nhân hóa theo sáng chế. “Trình tự tương đồng” được áp dụng với trình tự axit amin ở đây được xác định là trình tự có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 90%, 91%, 92%, 93%, hoặc 94%, và tốt hơn nữa là có độ tương đồng trình tự ít nhất là khoảng 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% đối với trình tự axit amin khác, như được xác định, ví dụ bằng phương pháp tìm FASTA liên quan đến Pearson and Lipman, 1988, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 85: 2444-2448.

Kháng thể nhân tạo bao gồm các đoạn scFv, nhị thể (diabodies), tam thể (triabodies), tứ thể (tetrabodies) và mm (tham khảo Winter, G. và Milstein, C, 1991, *Nature*, 349: 293-299; Hudson, P.J., 1999, *Current Opinion in Immunology*, 11: 548-

557), mỗi kháng thể này đều có khả năng liên kết kháng nguyên. Trong đoạn Fv chuỗi đơn (scFv), miền V_H và V_L của kháng thể được liên kết bởi peptit linh hoạt. Điển hình, peptit liên kết dài khoảng 15 dư lượng axit amin. Nếu liên kết nhỏ hơn, ví dụ 5 axit amin, thì diabodies được hình thành, là những chất nhị trùng scFv hóa trị hai. Nếu chất liên kết được giảm ít hơn ba dư lượng axit amin, các cấu trúc trimeric và tetrameric được hình thành được gọi là tam thể hoặc tứ thể. Đơn vị liên kết nhỏ nhất của kháng thể là CDR, đặc biệt là CDR2 của chuỗi nặng có đủ độ nhận dạng và liên kết cụ thể mà có thể được sử dụng riêng biệt. Đoạn như được gọi là đơn vị nhận dạng phân tử vậy hoặc mm. Một số mru như vậy có thể được liên kết với nhau bằng các peptit liên kết ngắn, do đó tạo thành một protein liên kết nhân tạo có tính ái lực cao hơn so với mru đơn lẻ.

Các đương lượng về mặt chức năng của đơn sáng chế này cũng đề gồm các kháng thể được điều chỉnh, ví dụ các kháng thể được điều chỉnh bằng liên kết cộng hóa trị của bất kỳ loại phân tử nào với kháng thể. Ví dụ, các kháng thể được điều chỉnh bao gồm các kháng thể đã được điều chỉnh chẳng hạn như bằng glycosyl hóa, axetyl hóa, pegyl hóa, phosphoryl hóa, amit hóa, dẫn xuất hóa bằng các nhóm bảo vệ/tách đã biết, tách phân giải protein, liên kết với phối tử của tế bào hoặc protein khác, v.v. Liên kết cộng hóa trị không ngăn cản kháng thể tạo ra phản ứng kháng idiotyp. Những điều chỉnh này có thể được tiến hành bằng những kỹ thuật đã biết, bao gồm tuy nhiên không giới hạn bởi, việc tách hóa học cụ thể, axetyl hóa, formyl hóa, tổng hợp metabolic của tunixamycin, v.v. Ngoài ra các kháng thể được điều chỉnh có thể bao gồm một hoặc nhiều axit amin phi cổ điển.

Các đương lượng về mặt chức năng có thể được tạo ra bằng cách trao đổi những CDR khác nhau trên những chuỗi khác nhau trong các khung khác nhau. Do đó, ví dụ, các nhóm kháng thể khác nhau có thể cho ra một bộ CDR bằng cách thế những chuỗi nặng khác nhau, trong đó ví dụ, các loại kháng thể IgG1-4, IgM, IgA1-2, IgD, IgE và các loại isotyp có thể được tạo ra. Tương tự, các kháng thể nhân tạo trong phạm vi của sáng chế có thể được tạo ra bằng cách thêm bộ CDR vào toàn bộ khung tổng hợp.

Các đương lượng về mặt chức năng có thể được tạo ra bằng cách gây đột biến, loại bỏ và/hoặc thêm vào nhiều trình tự vùng cố định và/hoặc vùng biến đổi ở bên cạnh bộ CDR cụ thể, sử dụng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các đoạn kháng thể và các đương lượng về mặt chức năng theo sáng chế chứa những phân tử đó với độ ràng buộc có thể phát hiện được của liên kết với CD38, khi so với kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39. Mức độ có thể phát hiện được của liên kết bao gồm toàn bộ giá trị trong khoảng từ ít nhất từ 10 đến 100%, tốt hơn ít nhất 50%, 60% hoặc 70%, tốt hơn nữa là ít nhất 75%, 80%, 85%, 90%, 95%, hoặc 99% khả năng liên kết của kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 ở chuột với CD38.

Các kháng thể được cải thiện

Các CDR có tầm quan trọng hàng đầu đối với việc nhận ra epitop và liên kết kháng thể. Tuy nhiên, những thay đổi có thể được tạo ra đối với các dư lượng bao gồm các CDR mà không can thiệp vào khả năng của kháng thể để nhận ra và liên kết epitop cùng gốc của nó. Ví dụ, những thay đổi không ảnh hưởng đến việc nhận ra epitop, nhưng làm tăng ái lực liên kết của kháng thể đối với các epitop có thể được thực hiện..

Do đó, cũng nằm trong phạm vi của sáng chế là những phiên bản được cải thiện của cả kháng thể ở loài chuột và kháng thể nhân hóa cũng nhận ra và liên kết đặc hiệu với CD38, tốt hơn có sự ái lực gia tăng.

Những nghiên cứu đã điều tra hiệu quả của việc đưa một hoặc nhiều axit amin thay đổi nhiều vị trí trong trình tự kháng thể, dựa trên kiến thức đã biết về trình tự kháng thể chính, dựa trên đặc tính của nó chẳng hạn như liên kết và mức độ biểu hiện (Yang, W. P. et al., 1995, J. Mol. Biol., 254 : 392-403; Rader, C. et al., 1998, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 95 : 8910-8915; Vaughan, T. J. et al., 1998, Nature Biotechnology, 16 : 535-539).

Trong những nghiên cứu này, các đương lượng của kháng thể chính được tạo ra bằng cách thay đổi các trình tự các gen của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ trong CDR1, CDR2, CDR3, hoặc những vùng khung, sử dụng các phương pháp đã biết chẳng hạn

như đột biến trực tiếp vị trí làm trung gian oligonucleotit, đột biến ghi lại, đặt nhằm PCR, xáo trộn AND, hoặc chủng đột biến của *E. coli* (Vaughan, T. J. et al., 1998, *Nature Biotechnology*, 16: 535-539; Adey, N. B. et al., 1996, Chapter 16, pp. 277-291, in "Phage Display của Peptides và Proteins", Eds. Kay, B. K. et al., Academic Press).

Các phương pháp thay đổi trình tự của kháng thể chính này đã tạo ra những ái lực được cải thiện của các kháng thể thứ cấp (Gram, H. et al., 1992, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89 : 3576-3580; Boder, E. T. et al., 2000, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 97: 10701-10705; Davies, J. và Riechmann, L., 1996, *Immunotechnology*, 2: 169-179; Thompson, J. et al., 1996, *J. Mol. Biol.*, 256: 77-88; Short, M. K. et al., 2002, *J. Biol. Chem.*, 277: 16365-16370; Furukawa, K. et al., 2001, *J. Biol. Chem.*, 276: 27622-27628).

Bằng một chiến lược định hướng tương tự là thay đổi một hoặc nhiều dư lượng axit amin của kháng thể, các trình tự kháng thể được mô tả trong sáng chế này có thể được sử dụng để phát triển các kháng thể kháng CD38 với những chức năng đã được cải thiện, bao gồm ái lực được cải thiện đối với CD38.

Những nhóm thế axit amin được ưu tiên là những chất mà: (1) giảm tính nhạy cảm của sự phân giải protein, (2) giảm tính nhạy cảm của quá trình oxi hóa, (3) thay đổi ái lực liên kết để hình thành các phức chất protein, và (4) trao hoặc thay đổi những đặc tính hóa lý hoặc chức năng khác của những chất tương tự. Những chất tương tự này có thể bao gồm nhiều mutein của trình tự hơn là trình tự peptit xảy ra tự nhiên. Ví dụ, các nhóm thế axit amin đơn hoặc đa (tốt hơn là các nhóm thế axit amin được bảo toàn) có thể được tạo ra trong những trình tự diễn ra tự nhiên (tốt hơn là trong một phần của chuỗi polypeptit bên ngoài (những) miền tạo nên những tiếp xúc liên phân tử. Nhóm thế axit amin được bảo toàn không nên thay đổi liên tiếp những đặc điểm về cấu trúc của trình tự gốc (ví dụ, axit amin thay thế không nên có xu hướng phá vỡ helix diễn ra trong trình tự gốc, hoặc làm hỏng các loại cấu trúc thứ cấp khác mang đặc tính của trình tự gốc). Những ví dụ về cấu trúc thứ cấp và thứ ba nhận ra chuỗi polypeptit được mô tả trong *Proteins, Structures and Molecular Principles* (Creighton, Ed., W. H. Freeman và Company, New York (1984)); *Introduction to*

Protein Structure (C. Branden and J. Tooze, eds., Garland Publishing, New York, N. Y. (1991)); và Thornton et al., 1991, Nature, 354: 105, được đề cập ở đây như tài liệu tham khảo.

Các kháng thể được cải thiện cũng bao gồm các kháng thể có các đặc tính đã được cải thiện được điều chế bằng các kỹ thuật tiêu chuẩn của miễn dịch ở động vật, sự hình thành hybridoma và lựa chọn các kháng thể có những đặc tính đặc biệt.

Những kháng thể được cải thiện theo sáng chế bao gồm các kháng thể cụ thể có các đặc tính chức năng được cải thiện. Một quan tâm đặc biệt là những kháng thể đó có tăng cường khả năng trung gian các chức năng của cơ quan tác động gây độc tế bào chẳng hạn như ADCC. Những kháng thể như vậy có thể thu được bằng cách tạo ra những nhóm thể đơn hoặc đa trong khung cố định của kháng thể, do đó làm thay đổi phản ứng của nó với thụ thể Fc. Các phương pháp tạo ra những đột biến như vậy có thể được tìm thấy trong ví dụ trong Lazar et al. (2006, Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 103(11): 4005-4010) và Okazaki et al. (2004, J. Mol. Biol. 336(5): 1239-49). Xem WO 03/074679, WO 2004/029207, WO 2004/099249, WO2006/047350, WO 2006/019447, WO 2006/105338, WO 2007/041635.

Cũng có thể sử dụng những dòng tế bào được tạo ra một cách đặc biệt để tạo ra những kháng thể được cải thiện. Cụ thể, những dòng tế bào này đã thay đổi sự điều chỉnh glycosyl, tạo ra các kháng thể được fucosyl hóa kém hoặc thậm chí hoàn toàn bị defucosyl hóa. Những dòng tế bào này và các phương pháp để tạo ra chúng được đề cập trong ví dụ như Shinkawa et al. (2003, J. Biol. Chem. 278(5): 3466-3473), Ferrara et al. (2006, J. Biol. Chem. 281(8): 5032-5036; 2006, Biotechnol. Bioeng. 93(5): 851-61), EP 1331266, EP 1498490, EP 1498491, EP 1676910, EP 1792987, và WO 99/54342.

Sáng chế cũng bao gồm các thể liên hợp gây độc tế bào. Những thể liên hợp gây độc tế bào này bao gồm hai thành phần chính, chất liên kết tế bào và chất gây độc tế bào.

Được sử dụng ở đây, thuật ngữ “chất liên kết tế bào” chỉ chất mà nhận ra một cách đặc biệt và liên kết các protein CD38 trên bề mặt tế bào. Theo một phương án, chất liên kết tế bào nhận ra một cách đặc biệt CD38 sao cho nó cho phép các thể liên

hợp phản ứng theo mục đích định sẵn với ít tác dụng phụ tạo ra từ việc liên kết không đặc hiệu.

Theo phương án khác, chất liên kết tế bào theo sáng chế cũng đặc biệt nhận ra protein CD38 sao cho các thể liên hợp sẽ được tiếp xúc với tế bào đích trong khoảng thời gian vừa đủ để cho phép phân thuốc gây độc tế bào của thể liên hợp phản ứng trên tế bào, và/hoặc cho phép các thể liên hợp đủ thời gian để được đồng hóa bởi tế bào.

Theo phương án được ưu tiên, các thể liên hợp gây độc tế bào bao gồm kháng thể kháng CD38 là chất liên kết tế bào, tốt hơn nữa là, các kháng thể đơn dòng kháng CD38 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 ở chuột. theo phương án được ưu tiên khác, chất liên kết tế bào là một phiên bản dạng khảm của kháng thể kháng CD38 nêu trên.

Theo khía cạnh được ưu tiên khác nữa, thể liên hợp gây độc tế bào bao gồm kháng thể nhân hóa 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 hoặc đoạn liên kết epitop của chúng. Kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 có thể nhận ra CD38 một cách đặc biệt, và dẫn chất gây độc tế bào vào tế bào bị khuyết tật hoặc mô, chẳng hạn như các tế bào ung thư, theo cách đã được định trước.

Thành phần thứ hai của các thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế là chất gây độc tế bào. Thuật ngữ “chất gây độc tế bào” được sử dụng ở đây là một chất làm giảm hoặc khóa chức năng hoặc sự phát triển của tế bào và/hoặc gây ra phá hủy tế bào.

Trong các phương án được ưu tiên, chất gây độc tế bào là một dược chất nhỏ, tiền thuốc, taxoit, maytansinoit chẳng hạn như DM1 hoặc DM4, dẫn xuất tomaymyxin, dẫn xuất leptomyxin, CC-1065 hoặc chất tương tự CC-1065. Trong các phương án được ưu tiên, các chất liên kết tế bào theo sáng chế được liên kết cộng hóa trị, trực tiếp hoặc qua một liên kết có thể hoặc không thể tách được với chất gây độc tế bào.

Các chất liên kết tế bào, chất gây độc tế bào và các chất liên kết được thảo luận chi tiết hơn dưới đây.

Các chất liên kết tế bào

Hiệu quả của các hợp chất theo sáng chế là các chất điều trị tùy thuộc vào sự lựa chọn cẩn thận chất liên kết tế bào thích hợp. Các chất liên kết tế bào có thể là bất kỳ loại nào hiện đã biết, hoặc trở nên biết, và bao gồm các peptit và không peptit. Chất liên kết tế bào có thể là bất kỳ hợp chất nào có thể liên kết tế bào, hoặc đặc hiệu hoặc không đặc hiệu. Nói chung, những chất như vậy có thể là các kháng thể (đặc biệt là các kháng thể đơn dòng), lymphokin, hoocmon, các yếu tố tăng trưởng, vitamin, phân tử vận chuyển dinh dưỡng (chẳng hạn như transferin), hoặc bất kỳ các nguyên tử hoặc phân tử liên kết tế bào.

Các ví dụ cụ thể hơn về chất liên kết tế bào có thể được sử dụng bao gồm:

- a) các kháng thể đa dòng;
- b) các kháng thể đơn dòng;
- c) các đoạn kháng thể chẳng hạn như Fab, Fab', và F(ab')₂, Fv (Parham, 1983, J. Immunol., 131: 2895-2902; Spring et al., 1974, J. Immunol., 113: 470-478; Nisonoff et al., 1960, arch. Biochem. Biophys., 89: 230-244);

Cụ thể, kháng thể đơn dòng kháng CD38 được chọn từ 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 có thể được sử dụng như chất liên kết tế bào theo sáng chế. Tương tự, chất liên kết tế bào có thể là phiên bản dạng khảm của một trong những kháng thể đơn dòng 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39. Tốt hơn là, kháng thể kháng CD38 nhân hóa được dùng làm chất liên kết kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn nữa là kháng thể kháng CD38 nhân hóa được chọn từ các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 được tái tạo bề mặt hoặc được nhân hóa.

Các chất gây độc tế bào

Theo phương án khác, kháng thể nhân hóa hoặc đoạn liên kết epitop của chúng có thể được liên hợp với dược chất chẳng hạn như maytansinoid, để tạo ra tiền thuốc

có đặc tính gây độc tế bào đặc biệt đối với các tế bào biểu hiện kháng nguyên bằng cách đưa được chất này vào protein CD38. Các thể liên hợp gây độc tế bào bao gồm những kháng thể như vậy và lượng nhỏ được chất có độc tính cao (chẳng hạn như maytansinoit, taxan, dẫn xuất toamymyxin, dẫn xuất leptomyxin và các chất tương tự CC-1065) có thể được sử dụng như liệu pháp điều trị khối u, chẳng hạn như u lympho, u gây bệnh bạch cầu và u đa tủy.

Chất gây độc tế bào được sử dụng trong thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế có thể là bất kỳ hợp chất nào mà làm chết tế bào hoặc gây chết tế bào hoặc có đặc tính làm giảm khả năng của tế bào. Các chất gây độc tế bào được ưu tiên bao gồm ví dụ, maytansinoit và chất tương tự maytansinoit, taxoit, dẫn xuất toamymyxin, dẫn xuất leptomyxin, CC-1065 và chất tương tự CC-1065, dolastatin và chất tương tự dolastatin được định nghĩa dưới đây. Những chất gây độc tế bào này được liên hợp với các kháng thể, các đoạn kháng thể, các đương lượng về mặt chức năng, các kháng thể được cải thiện và các chất tương tự của chúng như được đề cập ở đây.

Các thể liên hợp gây độc tế bào có thể được điều chế bằng phương pháp ngoài da (vitro). Để liên kết thuốc hoặc tiền thuốc với kháng thể, nhóm liên kết được sử dụng. Các nhóm liên kết phù hợp được biết đến trong lĩnh vực kỹ thuật và bao gồm các nhóm disulfua, nhóm sulfua hữu cơ, nhóm axit không bền, nhóm photolabile, nhóm peptit không bền, và nhóm este không bền. Các nhóm liên kết được ưu tiên bao gồm nhóm disulfua và nhóm sulfua hữu cơ. Chẳng hạn như, các thể liên hợp có thể được tạo ra bằng việc sử dụng phản ứng trao đổi disulfua hoặc tạo ra liên kết sulfua hữu cơ giữa kháng thể và thuốc hoặc tiền thuốc.

Các maytansinoit

Trong số các chất gây độc tế bào có thể được sử dụng trong sáng chế để tạo thành thể liên hợp gây độc tế bào là các maytansinoit và các chất tương tự maytansinoit. Những ví dụ maytansinoit thích hợp bao gồm maytansinol và các chất tương tự maytansinol. Các maytansinoit là các được chất mà ức chế sự hình thành vi ống và có độc tính cao đối với các tế bào ở động vật có vú.

Các ví dụ về các chất tương tự maytansinol thích hợp bao gồm những maytansinol mà có vòng thơm được điều chỉnh và maytansinol mà có những điều chỉnh ở những vị trí khác. Những maytansinoit thích hợp như vậy được mô tả trong bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 4,424,219; 4,256,746; 4,294,757; 4,307,016; 4,313,946; 4,315,929; 4,331,598; 4,361,650; 4,362,663; 4,364,866; 4,450,254; 4,322,348; 4,371,533; 6,333,410; 5,475,092; 5,585,499; và 5,846,545.

Những ví dụ cụ thể của những chất tương tự maytansinol thích hợp như vậy có vòng thơm được điều chỉnh bao gồm:

(1) C-19-dechloro (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,256,746) (điều chế bằng cách giảm LAH của ansamycin P2);

(2) C-20-hydroxy (or C-20-demethyl) +/-C-19-dechloro (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,361,650 và 4,307,016) (điều chế bằng dimethyl hóa sử dụng Streptomyces hoặc Actinomyces hoặc khử clo sử dụng LAH); và

(3) C-20-demethoxy, C-20-acyloxy (-OCOR), +/-dechloro (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,294,757) (điều chế bằng acyl hóa sử dụng acyl clorua).

Những ví dụ cụ thể về chất tương tự maytansinol thích hợp có các điều chỉnh ở những vị trí khác bao gồm:

(1) C-9-SH (U.S. Pat. No. 4,424,219) (được điều chế bằng cách maytansinol phản ứng với H₂S hoặc P₂S₅);

(2) C-14-alkoxymethyl (demethoxy/CH₂OR) (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,331,598);

(3) C-14-hydroxymethyl hoặc acyloxymethyl (CH₂OH hoặc CH₂OAc) (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,450,254) (được điều chế từ Nocardia);

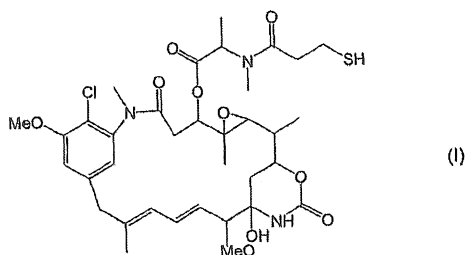
(4) C-15-hydroxy/acyloxy (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,364,866) (được điều chế bằng cách đảo maytansinol bằng Streptomyces);

(5) C-15-methoxy (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,313,946 và 4,315,929) (được phân lập từ Trewia nudiflora);

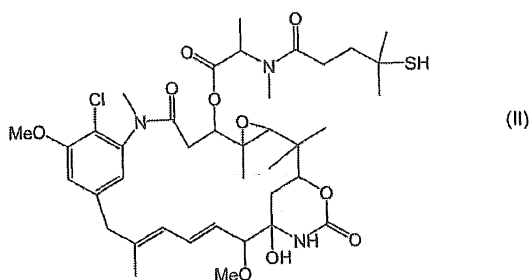
(6) C-18-N-demethyl (bằng sáng chế Hoa Kỳ số 4,362,663 và 4,322,348) (được điều chế bằng cách methyl hóa maytansinol bằng Streptomyces); và

(7) 4,5-deoxy (U.S. Pat. No. 4,371,533) (được điều chế bằng titan trichlorua/LAH giảm maytansinol).

Theo phương án được ưu tiên, các thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế sử dụng maytansinoit chứa thiol (DM1), thông thường được gọi là N2'-deacetyl-N2'-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin, như chất gây độc tế bào. DM1 được thể hiện bằng công thức cấu tạo (I) sau:



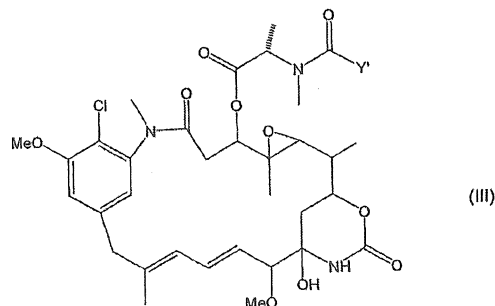
Theo phương án được ưu tiên khác, các thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế sử dụng maytansinoit chứa thiol N2'-deacetyl-N2'-(4-metyl-4-mercapto-1-oxopenty)-maytansin làm chất gây độc tế bào. DM4 được thể hiện bằng công thức cấu tạo (II) sau:



Trong các phương án được ưu tiên khác của sáng chế, những maytansin khác bao gồm các maytansinoit chứa disulfua và thiol gắn nhóm thế mono- hoặc dialkyl trên nguyên tử cacbon gắn nguyên tử sulfua, có thể được sử dụng. Những maytansin này bao gồm maytansinoit có C-3, C-14 hydroxymetyl, C-15 hydroxy, hoặc C-20 desmetyl, chuỗi bên axit amin acyl hóa có một nhóm acyl gắn một nhóm sulfhydryl bị cản trở, trong đó nguyên tử cacbon của nhóm acyl gắn nhóm chức thiol có một hoặc hai nhóm thế, những nhóm thế nêu trên là CH₃, C₂H₅, alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl mạch vòng hoặc alkenyl có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế, hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl và ngoài ra trong đó một trong những chất thế có thể

là H và trong đó nhóm acyl có chuỗi thẳng có độ dài ít nhất là ba nguyên tử cacbon giữa nhóm chức cacbon và nguyên tử sulfua.

Những maytansin bổ sung như vậy bao gồm các hợp chất được thể hiện bằng công thức (III):



trong đó:

Y' biểu hiện



trong đó

mỗi R_1 và R_2 độc lập là CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heterocyclic thơm và gốc heterocycloalkyl và ngoài ra R_2 có thể là H;

A, B, D là xycloalkyl hoặc xycloalkenyl có 3 -10 nguyên tử cacbon, aryl đơn hoặc được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl;

Mỗi R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} , và R_{12} độc lập là H, CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl;

mỗi l, m, n, o, p, q, r, s, và t độc lập là 0 hoặc số nguyên từ 1 đến 5, sao cho ít nhất hai trong số l, m, n, o, p, q, r, s và t không đồng thời bằng 0; và

Z là H, SR hoặc -COR, trong đó R là alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3

đến 10 nguyên tử cacbon, hoặc aryl đơn hoặc được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl.

Những phương án được ưu tiên có công thức (III) bao gồm các hợp chất có công thức (III) trong đó:

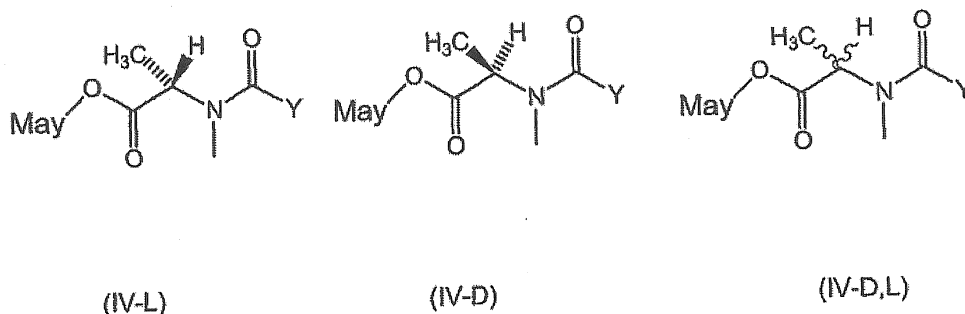
R_1 H, R_2 là methyl và Z là H.

R_1 và R_2 là methyl và Z là H.

R_1 là H, R_2 là methyl, và Z là $-SCH_3$.

R_1 và R_2 là methyl, và Z là $-SCH_3$.

Những maytansin bổ sung như vậy cũng bao gồm các hợp chất được thể hiện bằng công thức (IV-L), (IV-D), hoặc (IV-D,L):



Trong đó: Y biểu hiện $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

trong đó:

mỗi R_1 và R_2 độc lập là CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế, hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl, và ngoài ra R_2 có thể là H;

mỗi R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 và R_8 độc lập là H, CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế, hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl;

mỗi l, m và n độc lập là một số nguyên từ 1 đến 5, và ngoài ra n có thể là 0;

Z là H, SR hoặc $-COR$ trong đó R là alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch vòng có từ 3 đến 10

nguyên tử cacbon, hoặc aryl đơn hoặc được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl; và

Có thể biểu hiện maytansinoid tạo ra chuỗi bên tại C-3, C-14 hydroxymetyl, C-15 hydroxy hoặc C-20 desmetyl.

Những phương án được ưu tiên có công thức (IV-L), (IV-D) và (IV-D,L) bao gồm những hợp chất có công thức (IV-L), (IV-D) và (IV-D,L) trong đó:

R_1 là H, R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , và R_8 là H, I và mỗi m là 1, n là 0, và Z là H.

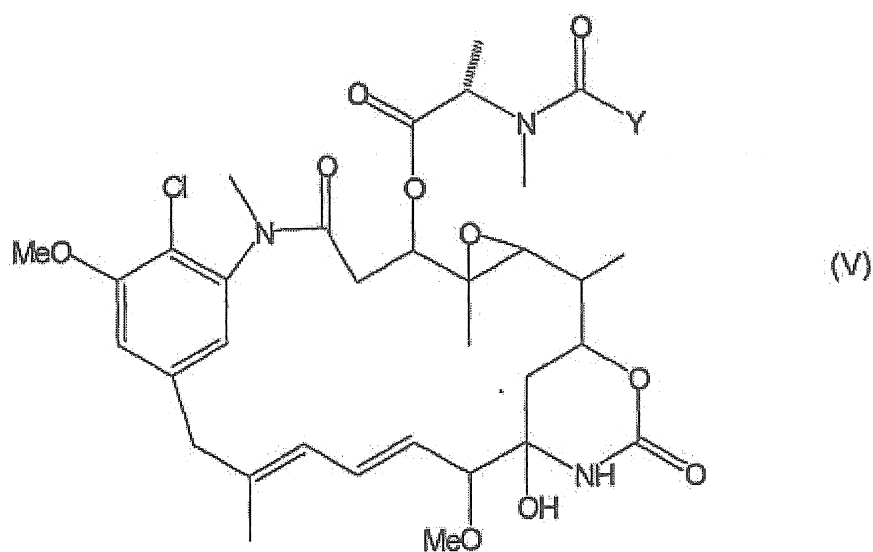
R_1 và R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , R_8 là H, I và m là 1, n là 0, và Z là H.

R_1 là H, R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , R_8 là H, I và mỗi m là 1, n là 0, và Z là -SCH₃.

R_1 và R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , R_8 là H, I và m là 1, n là 0, và Z là -SCH₃.

Tốt hơn chất gây độc tế bào được thể hiện bằng công thức (IV-L).

Những hợp maytansin bổ sung như vậy cũng bao gồm những hợp chất có công thức (V):



trong đó:

Y là $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ$,

trong đó:

mỗi R_1 và R_2 độc lập là CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl, và ngoài ra R_2 có thể là H;

mỗi R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , và R_8 độc lập là H, CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế, hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl;

mỗi l, m và n độc lập là một số nguyên từ 1 đến 5, và ngoài ra n có thể là 0; và

Z là H, SR hoặc -COR, trong đó R là alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, hoặc aryl đơn hoặc được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl.

Các phương án được ưu tiên của công thức (V) bao gồm các hợp chất có công thức (V) trong đó:

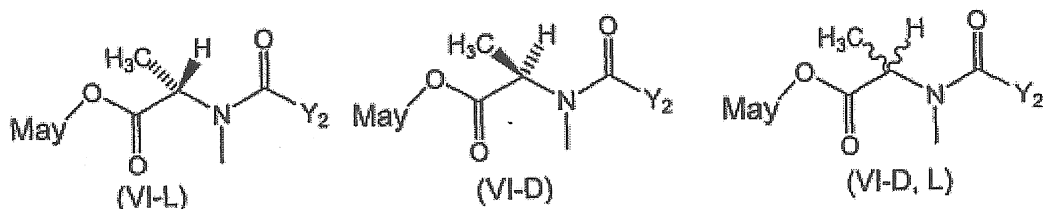
R_1 là H, R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , và R_8 là H; l và mỗi m là 1; n là 0; và Z là H.

R_1 và R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , và R_8 là H, l và m là 1; n là 0; và Z là H.

R_1 là H, R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , và R_8 là H, mỗi l và m là 1, n là 0, và Z là -SCH₃.

R_1 và R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , và R_8 là H, l và m là 1, n là 0, và Z là -SCH₃.

Những maytansin bổ sung như vậy ngoài ra còn bao gồm những hợp chất được thể hiện bằng công thức (VI-L), (VI-D), hoặc (VI-D,L):



trong đó:

Y_2 là $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

trong đó:

mỗi R_1 và R_2 là độc lập là CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl, và ngoài ra R_2 có thể là H;

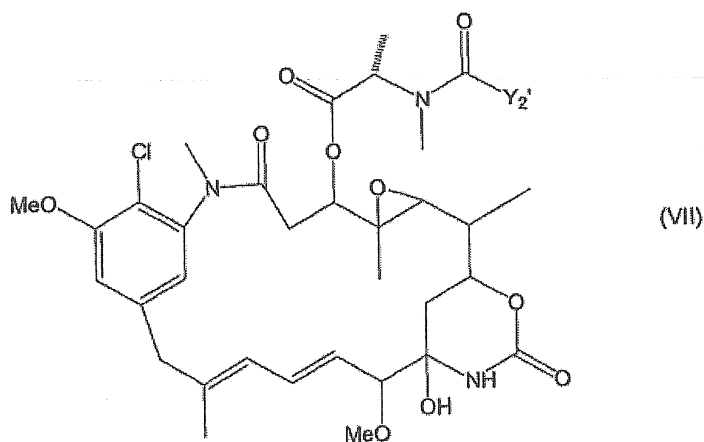
mỗi R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 và R_8 là độc lập là H, CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl;

mỗi l, m và n là độc lập là một số nguyên từ 1 đến 5, và ngoài ra n có thể là 0;

Z_2 là SR hoặc COR, trong đó R là alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, hoặc aryl đơn hoặc được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl, và

Có thể là maytansinoid.

Những maytansin bổ sung này cũng bao gồm các hợp chất có công thức (VII):



trong đó:

Y_2' là

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2SZ_2$,

trong đó:

mỗi R_1 và R_2 độc lập là CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch vòng có từ 3 đến 10

nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heteroxyclic thơm hoặc gốc heteroxycloalkyl, và ngoài ra R_2 có thể là H;

mỗi A, B, và D độc lập là xycloalkyl hoặc xycloalkenyl có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, aryl đơn hoặc được thế, hoặc heteroxyclic thơm hoặc gốc heteroxycloalkyl;

mỗi R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} và R_{12} độc lập là H, CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heteroxyclic thơm hoặc gốc heteroxycloalkyl;

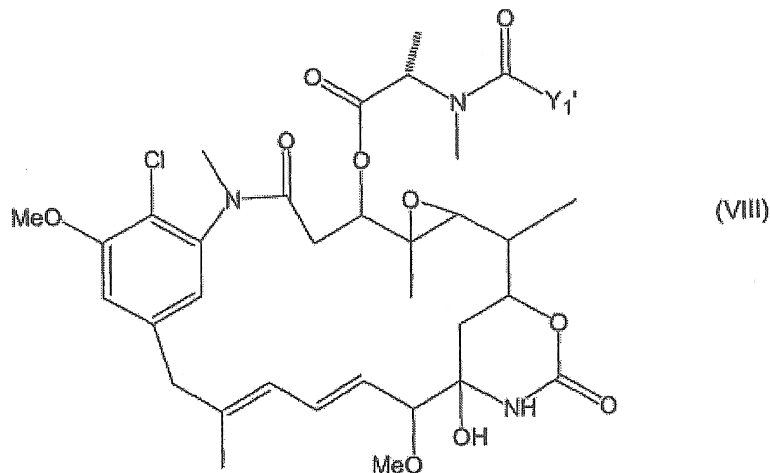
mỗi l, m, n, o, p, q, r, s, và t độc lập là 0 hoặc số nguyên từ 1 đến 5, sao cho ít nhất hai trong số l, m, n, o, p, q, r, s và t không đồng thời bằng 0; và

Z_2 là SR hoặc -COR, trong đó R là alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3-10 nguyên tử cacbon, hoặc aryl đơn hoặc được thế hoặc heteroxyclic thơm hoặc gốc heteroxycloalkyl.

Những phương án được ưu tiên có công thức (VII) bao gồm những hợp chất có công thức (VII) trong đó: R_1 là H và R_2 là metyl.

Những maytansinoit nêu trên có thể được liên hợp với kháng thể kháng CD38 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 hoặc chất đồng đẳng hoặc đoạn của chúng, trong đó kháng thể được liên kết với maytansinoit bằng cách sử dụng chức năng của disulfua hoặc thiol được thể hiện bằng nhóm acyl của chuỗi bên axit amin được acyl hóa được tìm thấy trong C-3, C-14 hydroxymetyl, C-15 hydroxy hoặc C-20 desmetyl của maytansinoit, và trong đó nhóm acyl của chuỗi bên axit amin được acyl hóa có chức năng thiol hoặc disulfua của nó ở nguyên tử cacbon có một hoặc hai nhóm thế, những nhóm thế nêu trên là CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heteroxyclic thơm hoặc gốc heteroxycloalkyl, và ngoài ra một trong những nhóm thế có thể là H, và trong đó nhóm acyl có độ dài chuỗi thẳng ít nhất là ba nguyên tử cacbon giữa cacbon chức năng và nguyên tử lưu huỳnh.

Thể liên hợp được ưu tiên của sáng chế là thể liên hợp bao gồm các kháng thể kháng CD38 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 hoặc chất đồng đẳng hoặc đoạn của chúng, được liên hợp với maytansinoit có công thức (VIII):



trong đó:

Y_1' là

$(CR_7R_8)_l(CR_9=CR_{10})_p(C\equiv C)_qA_r(CR_5R_6)_mD_u(CR_{11}=CR_{12})_r(C\equiv C)_sB_t(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

trong đó:

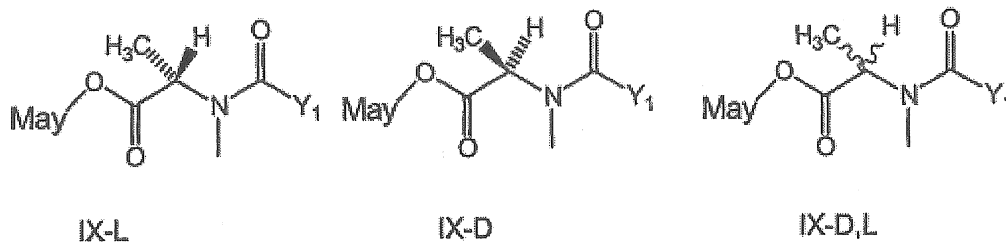
mỗi A, B, và D, độc lập là là xycloalkyl hoặc xycloalkenyl có 3 -10 nguyên tử cacbon, aryl đơn hoặc được thế, hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl;

mỗi R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 , R_8 , R_9 , R_{11} và R_{12} độc lập là H, CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl; và

mỗi l, m, n, o, p, q, r, s, và t độc lập là 0 hoặc một số nguyên từ 1 đến 5, sao cho ít nhất hai trong số l, m, n, o, p, q, r, s và t là không đồng thời bằng 0.

Tốt hơn là, R_1 là H và R_2 là methyl hoặc R_1 và R_2 là methyl.

một thể liên hợp được ưu tiên hơn của sáng chế là một thể liên hợp bao gồm kháng thể kháng CD38 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 hoặc chất đồng đẳng hoặc đoạn của chúng, được liên hợp với maytansinoit có công thức (IX-L), (IX-D), hoặc (IX-D,L):



trong đó:

Y_1 là $(CR_7R_8)_l(CR_5R_6)_m(CR_3R_4)_nCR_1R_2S-$,

trong đó:

mỗi R_1 và R_2 độc lập là CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế, heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl, và ngoài ra R_2 có thể là H;

mỗi R_3 , R_4 , R_5 , R_6 , R_7 và R_8 độc lập là H, CH_3 , C_2H_5 , alkyl hoặc alkenyl mạch thẳng có từ 1 đến 10 nguyên tử cacbon, alkyl hoặc alkenyl mạch nhánh hoặc mạch vòng có từ 3 đến 10 nguyên tử cacbon, phenyl, phenyl được thế hoặc heterocyclic thơm hoặc gốc heterocycloalkyl;

mỗi l, m và n độc lập là một số nguyên từ 1 đến 5, và ngoài ra n có thể là 0 và

Có thể là maytansin tạo ra chuỗi bên C-3, C-14 hydroxymetyl, C-15 hydroxy hoặc C-20 desmetyl.

Những phương án có công thức (IX-L), (IX-D) và (IX-D,L) bao gồm các hợp chất có công thức (IX-L), (IX-D) và (IX-D,L) trong đó:

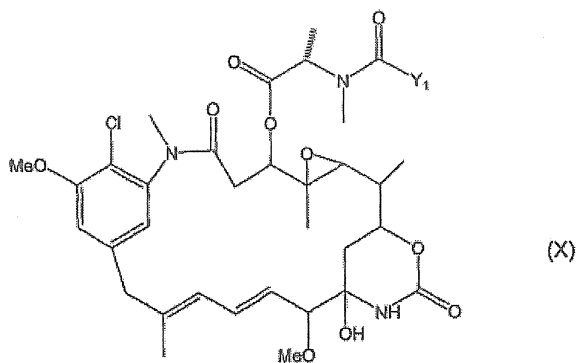
R_1 là H và R_2 là metyl hoặc R_1 và R_2 là metyl,

R_1 là H, R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 và R_8 là H; mỗi l và m là 1; n là 0,

R_1 và R_2 là metyl; mỗi R_5 , R_6 , R_7 và R_8 H; l và m là 1; n là 0.

Tốt hơn chất gây độc tế bào được thể hiện bằng công thức (IX-L).

Thể liên hợp được ưu tiên khác của sáng chế là một thể liên hợp bao gồm các kháng thể kháng CD38 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 hoặc chất đồng đẳng hoặc đoạn của chúng, được liên hợp với maytansinoit có công thức (X):



trong đó các nhóm thế được xác định theo công thức (IX) nêu trên.

Đặc biệt được ưu tiên là bất kỳ hợp chất nào trong số các hợp chất nêu trên, trong đó R_1 là H, R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 và R_8 là H, mỗi l và m là 1, và n là 0.

Đặc biệt được ưu tiên hơn nữa là hợp chất bất kỳ trong số các hợp chất nêu trên, trong đó R_1 và R_2 là metyl, mỗi R_5 , R_6 , R_7 , R_8 là H, l và m là 1, và n là 0.

Ngoài ra, L- aminoacyl stereoisom được ưu tiên.

Mỗi trong số maytansinoit được nêu trong đơn sáng chế Hoa Kỳ số 10/849,136, nộp ngày 20/5/2004, cũng có thể được sử dụng trong thể liên hợp gây độc tế bào của sáng chế. Chi tiết toàn bộ của đơn sáng chế Hoa Kỳ số 10/849,136 được đưa vào đây làm tài liệu tham khảo.

CÁC NHÓM LIÊN KẾT CHỨA DISULFUA

Để liên kết maytansinoit với chất liên kết tế bào, chẳng hạn như các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39, maytansinoit bao gồm gốc liên kết (linking moiety). Gốc liên kết này bao gồm một liên kết hóa học cho phép tạo ra các maytansinoit có hoạt tính đầy đủ ở một vị trí đặc biệt. Những liên kết hóa học thích hợp được biết đến trong tình trạng kỹ thuật và bao gồm các liên kết disulfua, liên kết axit không bền, liên kết quang không bền, liên kết pepit không bền và liên kết esteraza không bền. Được ưu tiên là các liên kết disulfua.

Gốc liên kết cũng bao gồm nhóm hóa chất hoạt tính. Theo phương án được ưu tiên, nhóm hóa chất hoạt tính trên có thể được liên kết cộng hóa trị với maytansinoit thông qua gốc liên kết disulfua.

Những nhóm hóa chất hoạt tính được ưu tiên cụ thể là các este N-succinimidyl và các este N- sulfosuccinimidyl.

Các maytansinoit được đặc biệt ưu tiên bao gồm gốc liên kết chứa nhóm hóa chất hoạt tính là các este C-3 của maytansinol và các chất tương tự của chúng trong đó gốc liên kết chứa liên kết disulfua và nhóm hoạt tính bao gồm este N-succinimidyl hoặc N-sulfosuccinimidyl.

Nhiều vị trí trên maytansinoit có thể đảm nhận vị trí đối với gốc liên kết hóa học. Chẳng hạn như, vị trí C-3 có nhóm hydroxy, vị trí C-14 được điều chỉnh bằng hydroxymetyl, vị trí C-15 được điều chỉnh bằng hydroxy và vị trí C-20 có nhóm hydroxy tất cả đều được hi vọng sẽ có ích. Tuy nhiên, vị trí C-3 được ưu tiên và vị trí C-3 của maytansinol được đặc biệt ưu tiên.

Trong khi việc tổng hợp các este của maytansinol có gốc liên kết được mô tả về các gốc liên kết chứa liên kết disulfua, người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực sẽ hiểu rằng những gốc liên kết có các liên kết hóa học (như được mô tả ở trên) có thể cũng được sử dụng với sáng chế, như những maytansinoit khác có thể. Những ví dụ cụ thể về các liên kết hóa học khác bao gồm liên kết axit không bền, liên kết quang không bền, liên kết peptit không bền và liên kết esteraza không bền. Sự bộc lộ của bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,208,020, được đưa vào đây hướng dẫn cách sản xuất các maytansinoit sinh ra những liên kết như vậy.

Việc tổng hợp matansinoit và những dẫn xuất maytansinoit có gốc liên kết disulfua tạo ra các nhóm hoạt tính được mô tả trong bằng sáng chế Hoa Kỳ các số 6,441,163 và 6,333,410, và đơn sáng chế Hoa Kỳ số 10/161,651, mỗi đơn trên được đưa vào đây làm tài liệu tham khảo.

Nhóm hoạt tính chứa maytansinoit, chẳng hạn như DM1, được phản ứng với kháng thể chẳng hạn như kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 để tạo ra các thể liên hợp gây độc tế bào. Những thể liên hợp này có thể được tinh chế bằng HPLC hoặc bằng cách lọc gen.

Một số cách tuyệt vời để tạo ra những thể liên hợp kháng thể maytansinoit như vậy được đề cập trong bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,333,410, và đơn sáng chế Hoa Kỳ số 09/867,598, 10/161,651 và 10/024,290, mỗi trong số chúng được đề cập một cách tổng thể ở đây.

Nhìn chung, dung dịch của kháng thể trong chất đệm dạng lỏng có thể được ủ với lượng maytansinoit vượt quá có gốc disulfua tạo ra nhóm hoạt tính. Hỗn hợp phản ứng có thể được làm nguội bằng cách bổ sung amin (chẳng hạn như etanolamin, taurin, v.v...). Thể liên hợp kháng thể maytansinoit sau đó có thể được tinh chế bằng cách lọc gen.

Số phân tử maytansinoit liên kết trên mỗi phân tử kháng thể có thể được quyết định bằng cách đo huỳnh quang tỷ lệ hấp thụ ở 252 nm và 280 nm. Trung bình từ 1 đến 10 phân tử maytansinoit trên một phân tử kháng thể là được ưu tiên.

Các thể liên hợp của kháng thể với thuốc maytansinoit có thể được đánh giá về khả năng của chúng để tiêu diệt nhiều dòng tế bào không mong muốn in vitro. Ví dụ các dòng tế bào như dòng tế bào Daudi lympho ở người, dòng Ramos lympho ở người, dòng MOLP-8 đa tủy ở người, và dòng MOLR-4 bệnh bạch cầu thể lympho cấp tính T ở người có thể dễ dàng được sử dụng để đánh giá tính gây độc tế bào của những hợp chất này. Các tế bào để đánh giá có thể đưa vào những hợp chất này trong 24 giờ và tỷ lệ sống sót của những tế bào này được tính toán trong thí nghiệm trực tiếp bằng các phương pháp đã biết. Các giá trị IC₅₀ sau đó có thể được tính toán từ những kết quả của thí nghiệm này.

Các nhóm liên kết chứa PEG.

Những maytasinoit cũng có thể được liên kết với các chất liên kết tế bào bằng cách sử dụng nhóm liên kết PEG, như được nêu trong đơn sáng chế Hoa Kỳ số 10/024,290. Các nhóm liên kết PEG này có thể hòa tan cả trong nước và trong dung môi không ở dạng lỏng, và có thể được sử dụng để liên kết một hoặc nhiều chất gây độc tế bào với chất liên kết tế bào. Các nhóm liên kết PEG tiêu biểu bao gồm các chất liên kết PEG hai chức năng liên kết với các chất gây độc tế bào và chất liên kết tế bào ở đầu đối diện của chất liên kết thông qua nhóm sulfhydryl hoặc disulfua chức năng tại một đầu, và este hoạt tính ở đầu khác.

Là một ví dụ tổng quát của quá trình tổng hợp thể liên hợp gây độc tế bào bằng cách sử dụng nhóm liên kết PEG, tài liệu tham khảo được đề cập trong đơn sáng chế Hoa Kỳ số 10/024,290 để biết thêm chi tiết.

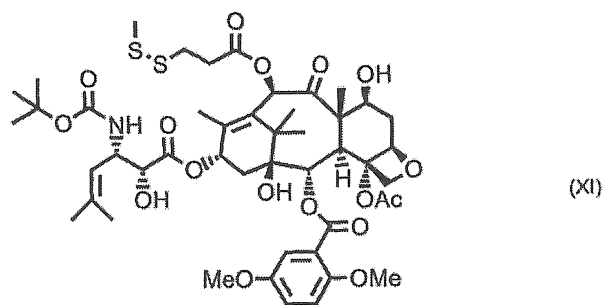
Quá trình tổng hợp bắt đầu với phản ứng của một hoặc nhiều chất gây độc tế bào tạo ra gốc PEG hoạt tính với chất liên kết tế bào, do đó thay thế các este hoạt tính đầu cuối của mỗi gốc PEG hoạt tính bằng dư lượng axit amin của chất liên kết tế bào, để tạo ra thể liên hợp gây độc tế bào bao gồm một hoặc nhiều chất gây độc tế bào được liên kết cộng hóa trị với chất liên kết tế bào thông qua nhóm liên kết PEG.

Các Taxan

Chất gây độc tế bào được sử dụng trong thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế cũng có thể là taxan hoặc dẫn xuất của chúng.

Các taxan là một họ hợp chất gồm paclitaxel (taxol), chất gây độc tế bào tự nhiên, và docetaxel (Taxotere), dẫn xuất bán tổng hợp, hai hợp chất này được sử dụng rộng rãi trong điều trị ung thư. Các taxan là các chất độc tính gián phân ngăn chặn sự polyme hóa của tubulin, do đó gây chết tế bào. Trong khi docetaxel và paclitaxel là các chất hữu ích trong điều trị ung thư, hoạt chất kháng u được hạn chế bởi độc tính không đặc hiệu đối với các tế bào bình thường. Ngoài ra, các hợp chất như paclitaxel và docetaxel mà tự nó là không có đủ tiềm năng để được sử dụng trong các thể liên hợp của các chất liên kết tế bào.

Một taxan được ưu tiên sử dụng trong việc điều chế các thể liên hợp gây độc tế bào là taxan có công thức (XI):



Các phương pháp tổng hợp taxan có thể được sử dụng trong các thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế, cùng với các phương pháp để liên hợp các taxan với các chất liên kết tế bào chẳng hạn như các kháng thể được mô tả chi tiết trong bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,416,064, 5,475,092, 6,340,701, 6,372,738 và 6,436,931, và trong đơn Hoa Kỳ các số 10/024,290, 10/144,042, 10/207,814, 10/210,112 và 10/369,563.

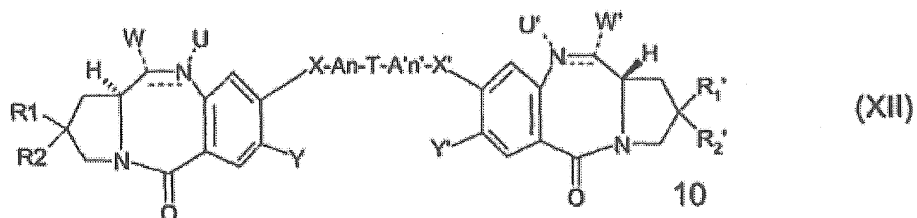
Các dẫn xuất tomaymyxin

Chất gây độc tế bào theo sáng chế cũng có thể là một dẫn xuất tomaymyxin. Các dẫn xuất tomaymyxin là pyrolo[1,4]benzodiazepin (PBDs), là nhóm hợp chất đã biết tạo ra những đặc tính sinh học của chúng bằng liên kết cộng hóa trị với N2 của guanin trong dãy ADN nhỏ. Các PBD bao gồm nhiều chất liên kết có dãy nhỏ chẳng hạn như anthramyxin, neothramyxin và DC-81.

Các dẫn xuất tomaymyxin mới có tính gây độc tế bào cao và có thể được liên kết hiệu quả với các chất liên kết tế bào được mô tả trong đơn sáng chế quốc tế số PCT/IB2007/000142 mà hàm lượng của chúng được đề cập ở đây làm tài liệu tham khảo. Các chất liên kết tế bào- các phức chất của dẫn xuất tomaymyxin cho phép đo được hoàn toàn hoạt tính gây độc tế bào của các dẫn xuất tomaymyxin được áp dụng trong phương pháp đã được định trước chống lại các tế bào không mong muốn, do đó tránh được các tác dụng phụ do những phá hủy đến những tế bào khỏe mạnh không có mục đích.

Chất gây độc tế bào theo sáng chế bao gồm một hoặc nhiều dẫn xuất tomaymyxin, được liên kết với các chất liên kết tế bào, chẳng hạn như các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 thông qua nhóm liên kết. Nhóm liên kết là một phần của gốc hóa chất mà được liên kết cộng hóa trị với dẫn xuất tomaymyxin bằng các phương pháp thông thường. Theo phương án được ưu tiên, gốc hóa chất có thể được liên kết cộng hóa trị với dẫn xuất tomaymyxin qua liên kết disulfua.

Các dẫn xuất tomaymyxin hữu ích trong sáng chế có công thức (XII) dưới đây:



trong đó

---- là liên liên kết đơn tùy ý;

===== là liên kết đơn hoặc liên kết đôi;

Sao cho khi --- hiển thị liên kết đơn, U và U', giống hoặc khác, độc lập là H, và W và W', giống nhau hoặc khác nhau, độc lập được chọn từ nhóm gồm OH, etc chẳng hạn như -OR, este (ví dụ axetat), chẳng hạn như -OCOR, cacbonat chẳng hạn như -OCOOR, carbamat chẳng hạn như -OCONRR', carbamat mạch vòng, sao cho N10 và C11 là một phần của vòng, ure chẳng hạn như -NRCONRR', thiocarbamat chẳng hạn như -OCSNHR, thiocarbamat mạch vòng sao cho N10 và C11 là một phần của vòng, -SH, sulfua chẳng hạn như -SR, sulphoxit chẳng hạn như -SOR, sulfon chẳng hạn như -SOOR, sulphonat chẳng hạn như -SO₃-, sulfonamit chẳng hạn như -NRSOOR, amin chẳng hạn như -NRR', amin mạch vòng tùy ý sao cho N10 và C11 là một phần của vòng, dẫn xuất hydroxylamin chẳng hạn như -NROR', amit chẳng hạn như -NRCOR, azido chẳng hạn như -N₃, xyano, halo, trialkyl hoặc triarylphosphoni, nhóm có nguồn gốc từ axit amin; tốt hơn là W và W' là giống nhau hoặc khác nhau và là OH, Ome, Oet, NHCONH₂, SMe;

và khi = hiển thị một liên kết đôi, U và U' không có mặt và W và W' là H;

■ R1, R2, R1', R2' là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ halogenua hoặc alkyl tùy ý được thế bằng một hoặc nhiều Hal, CN, NRR', CF₃, OR, aryl, Het, S(O)_qR, hoặc R1 và R2 và R1' và R2' cùng nhau tạo thành một nhóm chứa lần lượt liên kết đôi =B và =B'.

Tốt hơn là, R1 và R2 và R1' và R2' cùng nhau tạo thành một nhóm chứa lần lượt liên kết đôi =B và =B'.

■ B và B' là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ Alkenyl được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều Hal, CN, NRR', CF₃, OR, aryl, Het, S(O)_qR hoặc B và B' là một nguyên tử oxy.

Tốt hơn là, B=B'.

Tốt hơn nữa là, B=B'=CH₂ hoặc =CH-CH₃,

■ X, X' là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ một hoặc nhiều -O-, -NR-, -(C=O)-, -S(O)_q-.

Tốt hơn là, X=X'.

Tốt hơn nữa là, X=X'=O.

▪ A, A' là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ Alkyl hoặc Alkenyl tùy ý chứa oxy, nitơ hoặc nguyên tử lưu huỳnh, mỗi chất được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR, aryl, Het, Alkyl, Alkenyl.

Tốt hơn là, A=A'.

Tốt hơn nữa là, A=A'= alkyl không được thế mạch thẳng.

▪ Y, Y' là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ H, OR;

Tốt hơn là, Y=Y'.

Tốt hơn nữa là, Y=Y'=OAlkyl, tốt hơn nữa là OMetyl.

▪ T là -NR-, -O-, -S(O)_q-, hoặc aryl có từ 4 đến 10 cạnh, xycloalkyl, heteroxyclic hoặc heteroaryl, mỗi trong số chúng được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, và/hoặc (các) chất liên kết, hoặc Alkyl mạch nhánh, được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR và/hoặc (các) chất liên kết, hoặc alkyl mạch thẳng được thế bằng một hoặc nhiều Hal, CN, NRR', CF₃, OR, S(O)_qR và/hoặc (các) chất liên kết.

Tốt hơn, T là aryl có từ 4 đến 10 cạnh hoặc heteroaryl, tốt hơn nữa phenyl hoặc pyridyl, được thế tùy ý bằng một hoặc nhiều (các) chất liên kết.

Chất liên kết nêu trên bao gồm nhóm liên kết. Các nhóm liên kết thích hợp được biết đến trong tình trạng kỹ thuật và bao gồm nhóm thiol, sulfua, disulfua, các nhóm thioete, các nhóm axit không bền, nhóm nhạy cảm ánh sáng (photolabile), nhóm peptideza không bền và nhóm esteraza không bền. Được ưu tiên là nhóm disulfua và nhóm thioete.

Khi nhóm liên kết là nhóm chứa thiol-, sulfua (hoặc còn được gọi là thioete -S-) hoặc disulfua (-S-S-), chuỗi bên mang nhóm thiol, nhóm sulfua hoặc disulfua có thể là mạch thẳng hoặc mạch nhánh, thơm hoặc heteroxyclic. Một người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể nhận biết được những chuỗi bên thích hợp.

Tốt hơn là, chất liên kết nêu trên có công thức:



trong đó

G là liên kết đơn hoặc liên kết đôi, -O-, -S- hoặc -NR-;

D là liên kết đơn hoặc -E-, -E-NR-, -E-NR-F-, -E-O-, -E-O-F-, -E-NR-CO-, -E-NR-CO-F-, -E-CO-, -CO-E-, -E-CO-F-, -E-S-, -E-S-F-, -E-NR-C-S-, -E-NR-CS-F-;

Trong đó E và F là giống nhau hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ - (OCH₂CH₂)_iAlkyl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl(OCH₂CH₂)_i-Alkyl-, -(OCH₂CH₂)_i-, -(OCH₂CH₂)_iXycloalkyl(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iHeteroxyclic(OCH₂CH₂)_j-, (OCH₂CH₂)_iaryl(OCH₂CH₂)_j-, -(OCH₂CH₂)_iHeteroaryl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_iAlkyl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_i-, -Alkyl-(OCH₂CH₂)_iXycloalkyl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl(OCH₂CH₂)_iHeteroxyclic(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyi-(OCH₂CH₂)_iaryl(OCH₂CH₂)_j-, -Alkyl(OCH₂CH₂)_iHeteroaryl(OCH₂CH₂)_j-, Xycloalkyl-Alkyl-, -Alkyl-Xycloalkyl-, -Heteroxyclic-Alkyl-, -Alkyl-Heteroxyclic-, -Alkyl-aryl-, -aryl-Alkyl-, -Alkyl-Heteroaryl-, -Heteroaryl-Alkyl- mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

trong đó i và j, giống hệt nhau hoặc khác nhau là các số nguyên và độc lập được chọn từ 0, từ 1 đến 2000;

Z là -Alkyl- mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

p là 0 hoặc 1;

Z' là H, nhóm bảo vệ thiol chẳng hạn như COR, R₂O hoặc SR₂O, trong đó R₂O là H, metyl, Alkyl, được thể tùy ý Xycloalkyl, aryl, heteroaryl hoặc heteroxyclic, sao cho khi Z' là H, hợp chất nêu trên là tương đương với hợp chất tương ứng được tạo ra bởi việc tạo vòng trong phân tử tạo ra từ việc bổ sung nhóm thiol -SH trên liên kết imin -NH= của gốc PBD.

▪ n, n', giống hoặc khác nhau là 0 hoặc 1.

▪ q là 0, 1 hoặc 2.

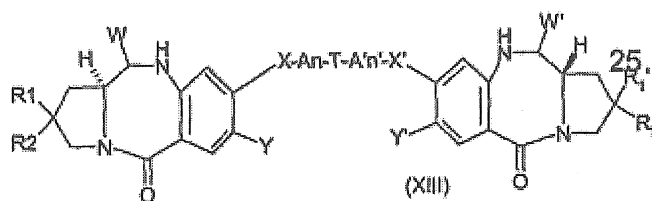
▪ R, R' là giống hoặc khác nhau và độc lập được chọn từ H, Alkyl, aryl, được thể tùy ý bằng Hal, CN, NRR', CF₃, R, OR, S(O)_qR, aryl, Het;

hoặc muối được dụng của chúng, hydrat, hoặc muối được hydrat hóa, hoặc cấu trúc tinh thể polymorphic của những hợp chất này hoặc chất đồng phân quang học của chúng, các hỗn hợp triệt quang, đồng phân không đối quang hoặc đồng phân đối hình.

Những hợp chất chung có công thức (XII) có hình học và stereoisome cũng là một phần của sáng chế.

Liên kết đôi N-10, C-11 của dẫn xuất tomaymyxin có công thức (XII) được biết đến là có thể sẵn sàng thay thế theo một đặc tính đảo ngược với các sản phẩm cộng imin tương ứng với sự có mặt của nước, rượu, thiol, amin bậc một hoặc bậc hai, ure và các ái nhân khác. Quy trình này có thể thay thế và dễ dàng tạo ra dẫn xuất tomaymyxin tương ứng với sự có mặt của chất khử nước, trong solvat hữu cơ không protic, trong chân không hoặc ở nhiệt độ cao (Z. Tozuka, 1983, *J. Antibiotics*, 36: 276).

Do đó, dẫn xuất có thể thay đổi của dẫn xuất tomaymyxin có công thức (XIII) cũng có thể được sử dụng trong sáng chế:



trong đó A, X, Y, n, T, A', X', Y', n', R1, R2, R1', R2' được xác định trong công thức (XII) và W, W' là giống nhau hoặc khác nhau và được chọn từ nhóm gồm OH, ete chẳng hạn như -OR, este (ví dụ axetat), chẳng hạn như -OCOR, -COOR, cacbonnat chẳng hạn như -OCOOR, carbamat chẳng hạn như -OCONRR', carbamat mạch vòng, sao cho N10 và C11 là một phần của vòng, ure chẳng hạn như -NRCONRR', thiocarbamat chẳng hạn như -OCSNHR, thiocarbamat mạch vòng, sao cho N10 và C11 là một phần của vòng, -SH, sulfua chẳng hạn như -SR, a sulphoxit chẳng hạn như -SOR, sulfon chẳng hạn như -SOOR, sulphonat chẳng hạn như -SO3-, sulfonamit chẳng hạn như -NRSOOR, amin chẳng hạn như -NRR', amin mạch vòng tùy ý, sao cho N10 và C11 là một phần của vòng, dẫn xuất hydroxylamin chẳng hạn như -NROR', amit chẳng hạn như -NRCOR, -NRCONRR', azido chẳng hạn như -N3, xyano, a halo, trialkyl hoặc triarylphosphoni, nhóm có nguồn gốc từ axit amin. Tốt hơn là, W và W' là giống nhau hoặc khác nhau và là OH, Ome, Oet, NHCONH2, SMe.

Các hợp chất có công thức (XIII) do đó cũng có thể được coi là các solvat, chứa nước khi dung môi là nước; những solvat này có thể là đặc biệt hữu ích.

Theo phương án được ưu tiên, dẫn xuất tomaymyxin theo sáng chế được chọn từ nhóm bao gồm trong:

8,8'-[1,3-benzendiylbis(metylenoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-metox-
1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[5-metox-1,3-benzendiylbis(metylenoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-
metox-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[1,5-pentandiylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-metox-1,2,3,11a-
tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[1,4-butanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-metox-1,2,3,11a-
tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[3-metyl-1,5-pentandiylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-metox-
1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[2,6-pyridinediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-metox-1,2,3,11a-
tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[4-(3-tert-butoxycarbonylaminopropyloxy)-2,6-pyridinediylbis-
(metylenoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-metox-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-
pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[5-(3-aminopropyloxy)-1,3-benzendiylbis(metylenoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-
yliden-7-metox-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[5-(N-metyl-3-tert-butoxycarbonylaminopropyl)-1,3-benzendiylbis-
(metylenoxy)]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-metox-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-
pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-{5-[3-(4-metyl-4-metyl-disulfanyl-pentanoylamino)propyloxy]-1,3-
benzendiylbis(metylenoxy)}-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-metox-1,2,3,11a-
tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[5-axetylthiometyl-1,3-benzendiylbis(metylenoxy)]-bis[(S)-2-metylen-7-
metox-1,2,3,11a-tetrahydro-5H-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

bis-{2-[(S)-2-metylen-7-metoxo-5-oxo-1,3,,11a-tetrahydro-5H-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-8-yloxy-etyl}-carbamic axit tert-butyl este

8,8'-[3-(2-axetylthioetyl)-1,5-pentanediylbis(oxy)]-bis[(S)-2-metylen-7-metoxo-1,2,3,11 a-tetrahydro-5H-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[5-(N-4-mercapto-4,4-dimetylbutanoyl)amino-1,3-benzendiylbis(metylenoxy)]-bis[7-metoxo-2-metylen-1,2,3,11 a-tetrahydro-5H-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin- 5-on]

8,8'-[5-(N-4-metyldithio-4,4-dimetylbutanoyl)-amino-1,3-benzendiylbis(metylenoxy)]-bis[7-metoxo-2-metylen-1,2,3,11 a-tetrahydro-5H-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-mercapto-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoxy)]-bis[7-metoxo-2-metylen-1,2,3,11 a-tetrahydro-5H-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[5-(N-metyl-N-(2-metyldithio-2,2-dimetyletyl)amino-1,3-benzendiyl(metylenoxy)]-bis[7-metoxo-2-metylen-1,2,3,11 a-tetrahydro-5H-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(4-(2-(4-mercapto-4-metyl)-pentanamido-etoxy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth~(E)-yliden-7-dimetoxo-1,2,3,11 a-tetrahydro-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(1-(2-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido-etoxy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxo-1,2,3,11 a-tetrahydro-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(4-(3-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido-propoxy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxo-1,2,3,11 a-tetrahydro-pyrolo[2,1-c][1,4] benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(4-(4-(4-metyl-4-metyldisulfanyl)-pentanamido-butoxy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxo-1,2,3,11 a-tetrahydro-pyrolo[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(4-(3-[4-(4-metyl-4-metyl-disulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(1-(3-[4-(4-metyl-4-metyl-disulfanyl-pentanoyl)-piperazin-1-yl]-propyl)-benzen-3,5-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyl-disulfanyi-pentanoylamino)-etoxy]-etoxy}-etoxy)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyl-disulfanyl-pentanoylamino)-etoxy]-etoxy}-etoxy)-etoxy]-etoxy}-benzen-3,5-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(1-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyl-disulfanyl-pentanoylamino)-etoxy]-etoxy}-etoxy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(4-(2-{2-[2-(2-{2-[2-(4-metyl-4-metyl-disulfanyl-pentanoylamino)-etoxy]-etoxy}-etoxy)-etoxy]-etoxy}-pyridin-2,6-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(1-(2-[r-metyl-(2-metyl-2-metyl-disulfanyl-propyl)-amino]-etoxy)-benzen-3,5-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

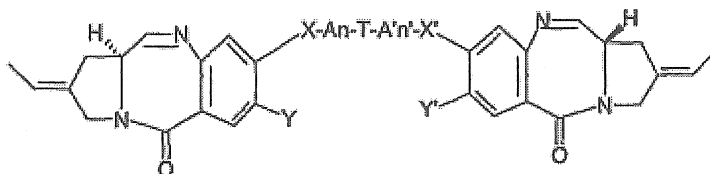
8,8'-[(4-(3-[metyl-(4-metyl-4-metyl-disulfanyl-pentanoyl-aminol-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

8,8'-[(4-(3-[metyl-(2-metyl-2-metyl-disulfanyl-propyl)-amino]-propyl)-pyridin-2,6-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

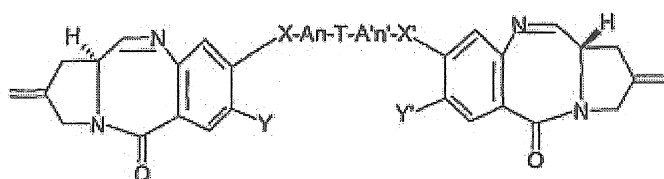
8,8'-[(1-(4-metyl-4-metyl-disulfanyl)-pentanamido)-benzen-3,5-dimetyl)-dioxy]-bis[(S)-2-eth-(E)-yliden-7-dimetoxy-1,2,3,11a-tetrahydro-pyrol[2,1-c][1,4]benzodiazepin-5-on]

Cũng như các dẫn xuất mercapto tương ứng, hoặc các muối được dụng của chúng, hydrat, hoặc muối được hydrat hóa, hoặc cấu trúc tinh thể của polymorphic của những hợp chất này hoặc chất đồng phân quang học của chúng, các hỗn hợp triệt quang, đồng phân không đối quang hoặc đồng phân đối hình.

Các hợp chất được ưu tiên có công thức sau:



hoặc



trong đó X, X', A, A', Y, Y', T, n, n' được xác định như trên.

Các hợp chất có công thức (XII) có thể được điều chế trong nhiều cách được những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực biết đến. Các hợp chất có thể được tổng hợp, chẳng hạn bằng cách áp dụng hoặc đưa vào các phương pháp được mô tả dưới đây, hoặc các phương pháp khác được đánh giá bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Những điều chỉnh và thay thế thích hợp sẽ được rõ ràng và biết đến hoặc có thể đạt được từ lĩnh vực kỹ thuật đối với những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực. Đặc biệt, những phương pháp như vậy có thể được tìm thấy trong R.C. L arock, *Comprehensive Organic Transformations*, Wiley-VCH Publishers, 1999.

Các phương pháp tổng hợp dẫn xuất tomaymyxin có thể được sử dụng trong sáng chế được mô tả trong đơn công bố sáng chế quốc tế số PCT/IB2007/000142. Những hợp chất theo sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều cách của các phương pháp tổng hợp. Các chất phản ứng và chất liệu khởi đầu có sẵn trên thị trường, hoặc được tổng hợp bằng những kỹ thuật đã được biết đến bởi những người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực (tham khảo, ví dụ, WO 00/12508, WO 00/12507, WO

2005/040170, WO 2005/085260, FR1516743, M. Mori et al., 1986, *Tetrahedron*, 42: 3793-3806).

Các phân tử liên hợp theo sáng chế có thể được hình thành bằng bất kỳ kỹ thuật đã biết nào. Dẫn xuất tomaymyxin của sáng chế có thể được liên kết với một kháng thể hoặc chất liên kết tế bào khác thông qua một chất liên kết axit không bền, hoặc chất liên kết nhạy cảm ánh sáng. Dẫn xuất có thể đông đặc với peptit có trình tự thích hợp và sau đó được liên kết với chất liên kết tế bào để tạo ra chất liên kết peptidaza không bền. Các thể liên hợp có thể được điều chế để chứa nhóm hydroxyl bậc một, có thể được succinyl hóa và được liên kết với chất liên kết tế bào để tạo ra thể liên hợp có thể được tách nội bào esteraza để giải phóng dẫn xuất tự do. Tốt hơn là, dẫn xuất được tổng hợp để chứa nhóm thiol được bảo vệ hoặc tự do, và sau đó một hoặc nhiều disulfua hoặc dẫn xuất chứa thiol được liên kết cộng hóa trị với chất liên kết tế bào thông qua liên kết disulfua hoặc liên kết thioete.

Nhiều phương pháp liên hợp được hướng dẫn trong USP 5,416,064 và USP 5,475,092. Dẫn xuất tomaymyxin có thể được điều chỉnh để tạo ra nhóm amin tự do và sau đó được liên kết với kháng thể hoặc chất liên kết tế bào khác thông qua chất liên kết axit không bền hoặc chất liên kết nhạy cảm ánh sáng. Dẫn xuất tomaymyxin có nhóm amin tự do hoặc carboxyl có thể được ngưng tụ với peptit và sau đó được liên kết với chất liên kết tế bào để tạo ra chất liên kết peptidaza không bền. Dẫn xuất tomaymyxin có nhóm hydroxyl tự do trên chất liên kết có thể được succinyl hóa và được liên kết với chất liên kết tế bào để tạo ra thể liên hợp có thể là được tách bởi esteraza nội bào để giải phóng thuốc tự do. Tốt nhất là, dẫn xuất tomaymyxin được xử lý để tạo ra nhóm thiol tự do hoặc được bảo vệ, và sau đó chất nhũ trùng tomaymyxin chứa disulfua hoặc thiol được liên kết với chất liên kết tế bào thông qua các liên kết disulfua.

Tốt hơn là, kháng thể đơn dòng hoặc chất liên kết tế bào-thể liên hợp của dẫn xuất tomaymyxin là những liên kết được kết nối thông qua liên kết disulfua, như được thảo luận ở trên, có khả năng tạo ra dẫn xuất tomaymyxin. Những thể liên hợp liên kết tế bào như vậy được điều chế bằng các phương pháp đã biết chẳng hạn như bằng điều chỉnh các kháng thể đơn dòng với succinimidyl pyridyl-dithiopropionat

(SPDP) (Carlsson et al., 1978, *Biochem. J.*, 173: 723-737). Nhóm thiopyridyl được tạo ra sau đó được thay thế bằng các xử lý với dẫn xuất tomaymyxin chứa thiol để tạo ra các thể liên hợp được liên kết disulfua. Ngoài ra, trong trường hợp dẫn xuất tomaymyxin-aryldithio, sự hình thành của thể liên hợp liên kết tế bào bị ảnh hưởng bởi sự thay thế trực tiếp của the aryl-thiol của dẫn xuất tomaymyxin bằng nhóm sulfhydryl đã được đưa vào các phân tử kháng thể. Các thể liên hợp chứa từ 1 đến 10 dẫn xuất thuốc tomaymyxin được liên kết thông qua cầu nối disulfua sẵn sàng được điều chế bằng phương pháp khác.

Đặc biệt hơn, dung dịch của the dithio-nitropyridyl được điều chỉnh kháng thể có nồng độ 2,5 mg/ml trong 0,05M chất đệm kali phosphat, độ pH 7,5 chứa 2 mM EDTA được xử lý với dẫn xuất tomaymyxin chứa thiol (1,3 mol eq./nhóm dithiopyridyl). Việc giải phóng thio-nitropyridin từ kháng thể đã được điều chỉnh được giám sát phổ quang học ở 325 nm và được hoàn tất trong khoảng 16 giờ. Thể liên hợp của dẫn xuất tomaymyxin-kháng thể được tinh chế và được giải phóng của thuốc không phản ứng và chất liệu có trọng lượng phân tử thấp khác bằng phương pháp lọc gen thông qua Sephadex G-25 hoặc Sephacryl S300. Số lượng gốc dẫn xuất tomaymyxin liên kết trên mỗi phân tử của kháng thể có thể được xác định bằng cách đo tỷ lệ hấp thụ ở 230 nm và 275 nm. Trung bình từ 1-10 dẫn xuất tomaymyxin phân tử/phân tử của kháng thể có thể được liên kết thông qua các liên kết disulfua bằng phương pháp này.

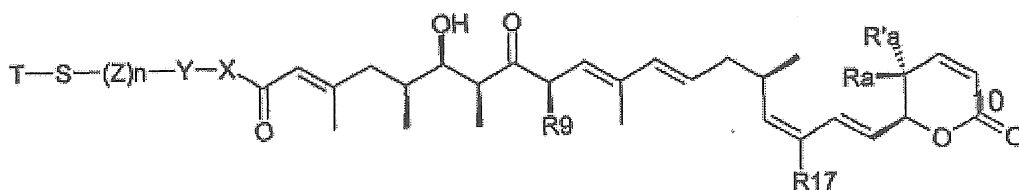
Hiệu quả của tính liên hợp trên ái lực liên kết cấu trúc với các tế bào biểu hiện kháng nguyên có thể được xác định bằng các phương pháp đã được mô tả bởi Liu et al., 1996, *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.*, 93: 8618-8623. Tính gây độc tế bào của dẫn xuất tomaymyxin và các thể liên hợp kháng thể của chúng liên kết với các dòng tế bào có thể được đo bằng phép ngoại suy của biểu đồ tăng trưởng tế bào như được mô tả trong Goldmacher et al., 1985, *J. Immunol.*, 135: 3648-3651. Tính gây độc tế bào của những hợp chất này để liên kết các dòng tế bào có thể được xác định bằng các thí nghiệm clonogenic như được mô tả trong Goldmacher et al., 1986, *J. Cell Biol.*, 102: 1312-1319.

Các dẫn xuất leptomyxin

Chất gây độc tế bào theo sáng chế cũng có thể là dẫn xuất leptomyxin.

Theo sáng chế, "dẫn xuất leptomyxin" chỉ các cạnh của họ leptomyxin được xác định trong Kalesse et al. (2002, *Synthesis* 8: 981-1003), và bao gồm: leptomyxin, chẳng hạn như leptomyxin A và leptomyxin B, callystatin, ratjadon chẳng hạn như ratjadon A và ratjadon B, anguimyxin chẳng hạn như anguimyxin A, B, C, D, kasusamycin, leptolstatin, leptofuranin, chẳng hạn như leptofuranin A, B, C, D. Dẫn xuất của leptomyxin A và B được ưu tiên.

Đặc biệt hơn là, dẫn xuất theo sáng chế có công thức (I):



(I)

trong đó

Ra và Ra' là H hoặc -Alk; tốt hơn Ra là -Alk, tốt hơn là methyl và Ra' là H;

R17 là alkyl được thế tùy ý bởi OR, CN, NRR', perfluoroalkyl; tốt hơn là, R17 là alkyl, tốt hơn nữa là methyl hoặc ethyl;

R9 là alkyl được thế tùy ý bởi OR, CN, NRR', perfluoroalkyl; tốt hơn là, R9 là alkyl, tốt hơn nữa là methyl;

X là -O- hoặc -NR-; tốt hơn là, X là -NR-;

Y là -U-, -NR-U-, -O-U-, -NR-CO-U-, -U-NR-CO-, -U-CO-, -CO-U-;

tốt hơn là, khi X là -O-, Y là -U-, -NR-U-, -U-NR-CO-;

trong đó U được chọn từ -Alk-, -Alk(OCH₂CH₂)_m-, -(OCH₂CH₂)_m-Alk-, -Alk(OCH₂CH₂)_m-Alk-, -(OCH₂CH₂)_m-, -Xycloalkyl-, -Heterocyclic-, -Xycloalkyl-Alk-, -Alk-Xycloalkyl-, -Heterocyclic-Alk-, -Alk-Heterocyclic- mạch thẳng hoặc mạch nhánh;

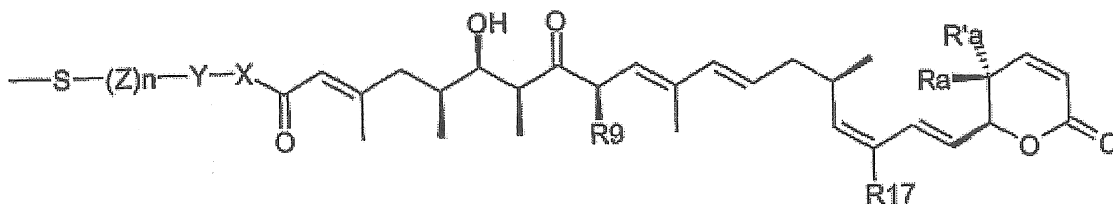
trong đó m là số nguyên được chọn từ 1 đến 2000;

tốt hơn là, U là -Alk- mạch thẳng hoặc mạch nhánh,

Z là -Alk-;

n là 0 hoặc 1; tốt hơn n là 0;

T là H, nhóm bảo vệ thiol chẳng hạn như Ac, R₁ hoặc SR₁, trong đó R₁ là H, methyl, Alk, Xycloalkyl, được thể tùy ý aryl hoặc heteroxyclic, hoặc T là



trong đó:

Ra, Ra', R17, R9, X, Y, Z, n như được xác định ở trên;

tốt hơn là, T là H hoặc SR_1 , trong đó R_1 là Alk, tốt hơn nữa là metyl;

R, R' giống nhau hoặc khác nhau là H hoặc alkyl;

Alk là alkyl mạch thẳng hoặc mạch nhánh; tốt hơn Alk là $(-(\text{CH}_2)_q (\text{CH}_3)_q)_p$ trong đó p là số nguyên từ 1 đến 10; và q là số nguyên từ 0 đến 2; tốt hơn là, Alk là $-(\text{CH}_2)-$ ou $-\text{C}(\text{CH}_3)_2-$.

hoặc muối được dụng của chúng, hydrat, hoặc muối được hydrat hóa, hoặc cấu trúc tinh thể polymorphic của những hợp chất này hoặc chất đồng phân quang học của chúng, các hỗn hợp triệt quang, đồng phân không đối quang hoặc đồng phân đối hình.

Các hợp chất được ưu tiên có thể được chọn từ:

(2-Metyisulfanyl-etyl)-amit của axit (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-Hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptametyl-19-((2S,3S)-3-metyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic

Bis-[(2-mercaptoethyl)-amit của axit (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptametyl-19-((2S,3S)-3-metyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca- 2,10,12,16,18-pentaenoic]

(2-mercapto-etyl)-amit của axit (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptametyl-19-((2S,3S)-3-metyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca- 2,10,12,16,18-pentaenoic

(2-metyldisulfanyl~etyl)-amit của axit (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptametyl-19-((2S,3S)-3-metyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic

(2-metyl-2-metyldisulfanyl-propyl)-amit của axit (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptametyl-19-((2S,3S)-3-metyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic

(2-mercapto-2-metyl-propyl)-amit của axit (2E,10E,12E,16Z,18E)-(R)-6-hydroxy-3,5,7,9,11,15,17-heptametyl-19-((2S,3S)-3-metyl-6-oxo-3,6-dihydro-2H-pyran-2-yl)-8-oxo-nonadeca-2,10,12,16,18-pentaenoic

Hoặc muối được dụng của chúng, các hydrat, hoặc muối được hydrat hóa, hoặc cấu trúc tinh thể polymorphic của những hợp chất này hoặc chất đồng phân quang học của chúng, các hỗn hợp triệt quang, đồng phân không đối quang hoặc đồng phân đối hình.

Để liên kết dẫn xuất đến chất liên kết tế bào, dẫn xuất phải bao gồm gốc (nhóm liên kết) cho phép các dẫn xuất được liên kết với chất liên kết tế bào thông qua một liên kết chẳng hạn như liên kết disulfua, liên kết sulfua (hoặc ở đây được gọi là thioete), nhóm axit không bền, nhóm nhạy cảm ánh sáng không bền, nhóm peptidaza không bền, hoặc nhóm esteraza không bền. Dẫn xuất được điều chế để chúng chứa gốc cần thiết để liên kết dẫn xuất leptomyxin với chất liên kết tế bào thông qua, ví dụ, liên kết disulfua, liên kết thioete, nhóm axit không bền, nhóm nhạy cảm ánh sáng không bền, nhóm peptidaza không bền, hoặc nhóm esteraza không bền. Để tăng thêm tính hòa tan trong dung dịch nước, nhóm liên kết có thể chứa chất đệm polyetylen glycol. Tốt hơn là, liên kết sulfua hoặc disulfua được sử dụng bởi việc giảm được môi trường của tế bào đích tạo ra việc tách sulfua hoặc disulfua và giải phóng các dẫn xuất có tính gây độc tế bào được liên kết tăng.

Các hợp chất của sáng chế có thể được điều chế bằng nhiều cách tổng hợp khác nhau. Chất phản ứng và chất liệu khởi đầu là có sẵn trên thị trường, hoặc được tổng hợp bởi các kỹ thuật đã biết bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật. các phương pháp tổng hợp 4172 61 dẫn xuất leptomycin có thể được sử dụng trong liên kết gây độc tế bào của sáng chế, cùng với các phương pháp liên kết nêu

trên dẫn xuất leptomyxin với tác nhân liên kết tế bào chẳng hạn như các kháng thể, được mô tả chi tiết trong đơn sáng chế châu Âu số 06290948.6, hàm lượng của chúng được đưa vào đây để tham khảo.

Các chất tương tự CC-1065

Chất gây độc tế bào được sử dụng trong thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế cũng có thể là CC-1065 hoặc dẫn xuất của chúng.

CC-1065 là kháng thể kháng u tiềm năng được phân lập từ việc nuôi cấy *Streptomyces zelensis*. CC-1065 là khoảng 1000-fold nhiều tiềm năng in vitro hơn là được sử dụng làm thuốc chống ung thư thông thường, chẳng hạn như doxorubicin, methotrexat và vincristin (B.K. Bhuyan et al., 1982, *Cancer Res.*, 42, 3532-3537). CC-1065 và các chất tương tự của chúng được mô tả trong bằng sáng chế Hoa Kỳ số 6,372,738, 6,340,701, 5,846,545 và 5,585,499.

Tiềm năng gây độc tế bào của CC-1065 được kết hợp với hoạt tính alkyl hóa của nó và hoạt tính liên kết ADN của nó hoặc hoạt tính đan xen ADN của nó. Hai hoạt tính này có vị trí ở hai phần khác nhau trong phân tử. Do đó, hoạt tính alkyl hóa được chứa trong đơn vị xyclopropapyroloindol (CPI) và hoạt tính liên kết ADN nằm trong hai đơn vị pyroloindol nhỏ hơn.

Mặc dù CC-1065 có đặc tính thu hút nhất định là chất gây độc tế bào, nó cũng có những hạn chế trong việc sử dụng để điều trị bệnh. Việc áp dụng của CC-1065 vào chuột gây ra tính gây độc gan bị làm chậm dẫn đến chết ở ngày thứ 50 sau khi tiêm vào nội bào với liều 12,5 µg/kg (V. L. Reynolds et al., 1986, *J. Antibiotics*, XXIX: 319-334). Điều này tạo ra các nỗ lực để phát triển các chất tương tự mà không gây ra độc tính chậm, và việc tổng hợp các chất tương tự đơn giản theo CC-1065 đã được mô tả (M.A. Warpehoski et al., 1988, *J. Med. Chem.*, 31: 590-603).

Trong nhiều chất tương tự khác, gốc CPI được thế bởi gốc xyclopropabenzindol (CBI) (D.L. Boger et al., 1990, *J. Org. Chem.*, 55: 5823-5833; D.L. Boger et al., 1991, *BioOrg. Med. Chem. Lett.*, 1: 115-120). Những hợp chất này duy trì tiềm năng trìn vitro cao của thuốc gốc, mà không gây ra độc tính chậm ở chuột. Tương tự như CC-1065, những hợp chất này là các chất alkyl hóa liên kết với

lượng nhỏ ADN trong đặc tính cộng hóa trị để gây chết tế bào. Tuy nhiên, việc đánh giá hiệu quả điều trị của các chất tương tự có triển vọng, Adozelesin và Carzelesin, đã dẫn đến những kết quả không tốt (B.F. Foster et al., 1996, *Investigational New Drugs*, 13: 321-326; I. Wolff et al., 1996, *Clin. Cancer Res.*, 2: 1717-1723). Những thuốc này có hiệu quả điều trị kém do độc tính đến hệ thống của chúng.

Hiệu quả điều trị của các chất tương tự CC-1065 có thể được cải thiện tốt bằng cách thay đổi sự phân bố in vitro thông qua việc truyền đến vị trí u mục tiêu, tạo ra độc tính thấp với các mô không mong muốn, và do đó, độc tính của hệ thống thấp. Để đạt được mục tiêu này, các thể liên hợp của những chất tương tự này và dẫn xuất của CC-1065 với các chất liên kết tế bào mà đặc biệt là các tế bào u đích được mô tả trong (bằng sáng chế Hoa Kỳ; 5,475,092; 5,585,499; 5,846,545). Những thể liên hợp này đặc biệt thể hiện tính gây độc tế bào cao in vitro, và hoạt tính kháng u khác ở u ở người dạng xenograft ở chuột (R. V. J. Chari et al., 1995, *Cancer Res.*, 55: 4079-4084).

Gần đây, các tiền dược chất của các chất tương tự CC-1065 có độ hòa tan tăng trong môi trường nước được mô tả (đơn sáng chế châu Âu số 06290379.4). Trong những tiền dược chất này, nhóm phenol của phần alkyl hóa của phân tử được bảo vệ bằng chức năng làm cho thuốc ổn định khi bảo quản trong dung dịch nước có tính axit, và tăng độ hòa tan trong nước với thuốc so với chất tương tự không được bảo vệ. Nhóm được bảo vệ được tách in vitro có độ pH thuộc sinh lý học để tạo ra thuốc có hoạt tính tương ứng. Trong những tiền dược chất được mô tả trong EP 06290379.4, chất thể phenol được bảo vệ như axit sulfonic chứa phenyl carbamat chứa điện tích có độ pH thuộc sinh lý học, và do đó có độ hòa tan trong nước được nâng cao. Để tăng độ hòa tan trong nước, chất đệm polyetylen glycol tùy chọn có thể được đưa vào chất liên kết giữa đơn vị indolyl nhỏ và liên kết có thể tách được chẳng hạn như nhóm disulfua. Việc áp dụng chất đệm này không làm thay đổi tiềm năng của thuốc.

Các phương pháp tổng hợp các chất tương tự CC-1065 có thể được sử dụng trong các thể liên hợp gây độc tế bào của sáng chế, cùng với các phương pháp để liên hợp các chất tương tự vào chất liên kết tế bào chẳng hạn như các kháng thể, được mô

tả chi tiết trong EP 06290379.4 (hàm lượng của chúng được đưa vào đây để tham khảo) và bằng sáng chế Hoa Kỳ số 5,475,092, 5,846,545, 5,585,499, 6,534,660 và 6,586,618 và trong đơn đăng ký sáng chế Hoa Kỳ số 10/116,053 và 10/265,452.

Các thuốc khác

Các thuốc chẳng hạn như methotrexate, daunorubicin, doxorubicin, vincristine, vinblastine, melphalan, mitomycin C, chlorambucil, calicheamicin, tubulysin và các chất tương tự tubulysin, duocarmycin và các chất tương tự duocarmycin, dolastatin và các chất tương tự dolastatin là cũng phù hợp để điều chế thể liên hợp của sáng chế. Các phân tử thuốc cũng có thể được liên kết với các phân tử kháng thể thông qua một phân tử chất mang trung gian chẳng hạn như huyết thanh albumin. Các hợp chất Doxorubicin và Daunorubicin, như được mô tả, ví dụ, trong Tạp chí Hoa Kỳ số 09/740991, cũng có thể là những chất gây độc tế bào hữu ích.

Chế phẩm trị liệu

Sáng chế cũng đề cập đến chế phẩm trị liệu dùng để điều trị chứng rối loạn chức năng tăng sinh hoặc bệnh viêm nhiễm hoặc bệnh tự miễn dịch ở động vật có vú bao gồm lượng hợp chất hữu hiệu trong việc điều trị của hợp chất theo sáng chế và một chất mang được dụng.

Theo một phương án, dược phẩm nêu trên là để điều trị bệnh ung thư, bao gồm (nhưng không giới hạn ở): ung thư biểu mô, bao gồm của bàng quang, vú, ruột kết, thận, gan, phổi, buồng trứng, tụy, dạ dày, cổ tử cung, tuyến giáp, và da; bao gồm tế bào ung thư biểu mô; tế bào khối u sinh huyết của dòng lympho, bao gồm bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu lympho cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, u lympho tế bào B, u lympho tế bào T, u lympho Burkitt; các khối u sinh huyết của dòng tủy, bao gồm bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính và mãn tính và bệnh bạch cầu promyelocytic; các khối u của gốc mô giữa, bao gồm sarcoma mô mềm và sarcoma cơ vân; các khối u khác, bao gồm khối u sắc tố, khối u tinh, tetratocarcinoma, u nguyên bào thần kinh và u thần kinh đệm; các khối u của hệ thần kinh trung ương và hệ thần kinh ngoại biên, bao gồm u bào hình sao, u nguyên bào thần kinh, u thần kinh

đệm, và các khối u dây thần kinh vùng cổ; các khối u của gốc mô giữa, bao gồm sarcoma mô mềm, sarcoma cơ vân, và sarcoma xương; và các khối u khác, bao gồm u sắc tố, xeroderma pigmentosum, keratoactanthoma, u tinh, bệnh khô da sắc tố, u quá sản sừng, u tinh, ung thư thể nang và teratocarcinoma, và các bệnh ung thư khác chưa được xác định trong đó CD38 được biểu hiện phần lớn. Theo phương án được ưu tiên, được phẩm theo sáng chế được sử dụng để điều trị bệnh ung thư chẳng hạn như u lympho không phải Hodgkin, u lympho Hodgkin, bệnh bạch cầu tế bào tóc, đa u tủy, bệnh bạch cầu thể lympho mãn tính, bệnh bạch cầu dòng tủy mãn tính, bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính, hoặc bệnh bạch cầu thể lympho cấp tính, trong đó CD38 được biểu hiện, và các bệnh ung thư khác chưa được xác định trong đó CD38 được biểu hiện chủ yếu. Theo phương án khác, được phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh tự miễn dịch chẳng hạn như bệnh lupus ban đỏ toàn thân, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh đa xơ cứng, bệnh Crohn's, viêm loét đại tràng, viêm dạ dày, viêm tuyến giáp Hashimoto, viêm cột sống dính khớp, viêm mạch globulin lạnh trong máu liên quan đến viêm gan C, viêm não khu trú mãn tính, bỏng rộp dạng pemphigus, bệnh máu khó đông A, viêm cầu thận tăng sinh màng, hội chứng Sjogren, viêm đa cơ ở trẻ vị thành niên và người lớn, viêm đa cơ ở người lớn, mày đay mãn tính, viêm xơ gan ống mật, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, viêm dây thần kinh tủy, bệnh loạn năng tuyến giáp dạng Grave, bỏng rộp dạng pemphigus, viêm cầu thận tăng sinh màng, hội chứng Churg-Strauss, và bệnh hen suyễn. Theo phương án khác, được phẩm nêu trên đề cập đến sự rối loạn khác chẳng hạn như, ví dụ, thải ghép, chẳng hạn như thải ghép thận, thải ghép gan, thải ghép phổi, thải ghép tim, và thải ghép tủy xương; bệnh kháng lại mô cấy ghép; bệnh lây nhiễm do virus, chẳng hạn như bệnh truyền nhiễm mV, bệnh truyền nhiễm HIV, AIDS, v.v.; và bệnh ký sinh trùng, chẳng hạn như bệnh nhiễm khuẩn giardias, bệnh lỵ do amip gây nên, bệnh sản mán, và các bệnh khác như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Sáng chế đề cập đến được phẩm bao gồm:

a) lượng kháng thể hiệu quả, đoạn kháng thể hoặc thể liên hợp kháng thể theo sáng chế, và;

b) chất mang được dụng mà có thể trợ hoặc hoạt tính sinh lý học.

Như được sử dụng ở đây, "chất mang được dụng" bao gồm bất kỳ và toàn bộ các dung môi, môi trường phân tán, vỏ bọc, các chất kháng khuẩn và chống nấm, và chất tương tự thích hợp về mặt sinh lý học. Các ví dụ của chất mang thích hợp, các chất hòa tan và/hoặc tá dược bao gồm một hoặc nhiều nước, muối, phosphat của muối được làm chất đệm, dextroza, glyxerin, etanol, và chất tương tự, cũng như sự kết hợp của chúng. Trong nhiều trường hợp, sẽ được ưu tiên đến bao gồm các chất bảo toàn thứ tự (isotonic), chẳng hạn như đường, rượu đa chức, hoặc natriclorua trong chế phẩm. Đặc biệt, đề cập đến các ví dụ của chất mang thích hợp bao gồm: (1) phosphat của muối được làm chất đệm của Dulbecco, độ pH ~ 7,4, chứa hoặc không chứa khoảng từ 1 mg/ml đến 25 mg/ml huyết thanh albumin ở người, (2) 0,9% muối (0,9% trọng lượng/thể tích Natriclorua (NaCl)), và (3) 5% (trọng lượng/thể tích) dextroza; và cũng có thể chứa chất chống oxy hóa chẳng hạn như tryptamin và chất ổn định chẳng hạn như Tween 20.

Các chế phẩm ở đây cũng có thể chứa chất trị liệu khác, là cần thiết cho việc điều trị chứng rối loạn đặc biệt. Tốt hơn là, kháng thể, đoạn kháng thể hoặc thể liên hợp kháng thể theo sáng chế, và hợp chất hoạt tính bổ sung sẽ có các hoạt tính bổ sung, mà không ảnh hưởng xấu đến chất khác. Theo phương án được ưu tiên, chất trị liệu khác là một chất đối vận của yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố mô (TF), protein C, protein S, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), heregulin, protein kích thích đại thực bào (MSP) hoặc yếu tố tăng trưởng nội mô tim (VEGF), hoặc chất đối vận của thụ thể đối với yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố mô (TF), protein C, protein S, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), heregulin, protein kích thích đại thực bào (MSP), hoặc yếu tố tăng trưởng nội mô tim (VEGF), bao gồm thụ thể HER2, thụ thể HER3, c-MET, và thụ thể tyrosin kinaza khác. Theo phương án được ưu tiên, chất trị liệu khác là một chất hướng đến các cụm kháng nguyên biệt hóa (CD), bao gồm CD3, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40, CD44, CD52, CD55, CD59, CD56, CD70, CD79, CD80, CD103, CD134,

CD137, CD138, và CD152. Theo phương án được ưu tiên, chất trị liệu khác là chất trị liệu hóa học hoặc điều biến miễn dịch.

Chế phẩm theo sáng chế có thể có rất nhiều dạng. Những dạng này bao gồm ví dụ dạng liều lượng lỏng, bán rắn, và rắn, tuy nhiên dạng được ưu tiên phụ thuộc vào cách phương pháp điều trị dự kiến và ứng dụng trị liệu. Chế phẩm được đặc biệt ưu tiên là có dạng dung dịch có thể pha được hoặc có thể tiêm được. Phương pháp áp dụng được ưu tiên là ngoài đường tiêu hóa (ví dụ trong tĩnh mạch, trong cơ, trong màng bụng, dưới da). Theo phương án được ưu tiên, chế phẩm theo sáng chế được áp dụng trong tĩnh mạch như viên thuốc hoặc bằng cách hòa tan liên tục qua thời gian. Theo phương án được ưu tiên khác, chúng được tiêm bắp, dưới da, trong khớp, trong bao hoạt dịch, trong miệng, phúc mạc, thải ghép, hoặc các tuyến perilesional, để áp dụng tại chỗ cũng như các hiệu quả trị liệu hệ thống.

Chế phẩm vô trùng để áp dụng ngoài đường tiêu hóa có thể được điều chế bằng cách đưa kháng thể, đoạn kháng thể hoặc thể liên hợp kháng thể theo sáng chế với lượng yêu cầu vào trong dung môi phù hợp, tiếp theo là quá trình khử trùng bằng cách vi lọc. Là dung môi hoặc tá dược lỏng, có thể sử dụng nước, muối, phosphat của muối nền, dextroraza, glyxerin, etanol, và chất tương tự, cũng như sự kết hợp của chúng. Trong nhiều trường hợp, sẽ được ưu đến bao gồm các chất đẳng trương, chẳng hạn như đường, rượu đa chức, hoặc Natri clorua trong chế phẩm. Các chế phẩm này cũng có thể chứa các chất hỗ trợ, đặc biệt là các chất làm ẩm, đồng vị hóa, nhũ tương hóa, các chất phân tán và ổn định. Chế phẩm vô trùng để áp dụng ngoài đường tiêu hóa cũng có thể được điều chế dưới dạng của các chế phẩm vô trùng rắn có thể hòa tan tại thời điểm sử dụng trong việc vô trùng nước hoặc bất kỳ dung dịch vô trùng có thể tiêm được nào khác.

Kháng thể, đoạn kháng thể hoặc thể liên hợp kháng thể theo sáng chế cũng có thể được áp dụng bằng đường miệng. Các chế phẩm dạng rắn để áp dụng qua đường miệng là các viên nén, viên thuốc, bột (viên con nhộng, túi) hoặc hạt nhỏ có thể được sử dụng. Trong các chế phẩm này, các thành phần hoạt tính theo sáng chế được trộn với một hoặc nhiều chất hòa tan trợ, chẳng hạn như tinh bột, xenluloza, sucroza, lactoza hoặc silic dioxit, dưới điều kiện dòng agon. Các chế phẩm này cũng có thể

bao gồm các hợp chất ngoài các chất hòa tan, ví dụ một hoặc nhiều dầu trơn chẳng hạn như magie stearat hoặc đá tan, chất tạo màu, chất bọc (viên thuốc được bọc bằng đường) hoặc men.

Các chế phẩm dạng lỏng để áp dụng qua đường miệng, có thể là dung dịch được dụng, chất hồi lưu, nhũ tương, xirô và cốm ngọt chứa chất hòa tan trơ chẳng hạn như nước, etanol, glyxerin, dầu thực vật hoặc dầu hỏa được sử dụng. Các chế phẩm này có thể bao gồm các hợp chất khác ngoài những chất hòa tan, ví dụ chất làm ẩm, chất làm ngọt, chất làm dày, chất tạo hương hoặc các chất làm ổn định

Các liều lượng phụ thuộc vào hiệu quả mong muốn, trong suốt thời gian điều trị và đường dùng; nói chung các liều lượng này nằm trong khoảng từ 5mg đến 1000mg mỗi ngày dùng theo đường uống đối với người trưởng thành với các liều lượng đơn vị nằm trong khoảng từ 1mg đến 250mg hoạt chất. Nói chung, bác sĩ sẽ xác định liều thích hợp phụ thuộc vào tuổi, cân nặng và các yếu tố cụ thể bất kỳ khác cho đối tượng được điều trị.

Phương pháp điều trị được sử dụng

Theo phương án khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm chết tế bào CD38⁺ bằng cách cho bệnh nhân có nhu cầu điều trị sử dụng kháng thể mà liên kết với CD38 nêu trên và có khả năng làm chết tế bào CD38⁺ nêu trên bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, ADCC, và/hoặc CDC. Dạng bất kỳ của các kháng thể, các đoạn kháng thể, hoặc các thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế, có thể được sử dụng để điều trị. Theo cách đó, sáng chế gồm việc sử dụng các kháng thể đơn dòng kháng CD38, các đoạn, hoặc các thể liên hợp gây độc tế bào của các kháng thể này làm thuốc trị bệnh.

Theo phương án được ưu tiên, các kháng thể, các đoạn kháng thể, hoặc các thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế được sử dụng để điều trị rối loạn chức năng tăng sinh hoặc bệnh viêm hoặc bệnh tự miễn ở động vật có vú. Trong phương án được ưu tiên khác, một trong số các dược phẩm được bộc lộ ở trên, và các dược phẩm này chứa kháng thể, đoạn kháng thể, hoặc thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế, được sử dụng để điều trị rối loạn chức năng tăng sinh ở động vật có vú. Theo một

phương án, bệnh rối loạn này là bệnh ung thư. Cụ thể là, bệnh ung thư này là bệnh ung thư di căn.

Do đó, các dược phẩm theo sáng chế là hữu ích trong việc điều trị hoặc ngăn ngừa lượng lớn các bệnh ung thư, bao gồm (nhưng không giới hạn) những bệnh sau: ung thư biểu bì, gồm các bệnh ung thư bàng quang, ngực, đại tràng, thận, gan, phổi, buồng trứng, tuyến tụy, dạ dày, cổ, tuyến giáp và da; gồm tế bào ung thư biểu mô; tế bào khối u sinh huyết của dòng lympho, gồm bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu lympho cấp tính, bệnh bạch cầu nguyên bào lympho cấp tính, u lympho tế bào B, u lympho tế bào T, u lympho Burkitt; các khối u sinh huyết của dòng tủy, gồm các bệnh bạch cầu dòng tủy cấp tính và mãn tính và bệnh bạch cầu promyelocytic; các khối u của gốc mô giữa, gồm sarcoma mô mềm và sarcoma cơ vân; và các khối u khác, gồm u sắc tố, khối u tinh, teratocarcinoma, u nguyên bào thần kinh và u thần kinh đệm; các khối u thuộc hệ thần kinh trung ương và hệ thần kinh ngoại biên, gồm u bào hình sao, u nguyên bào thần kinh, u thần kinh đệm, và các khối u dây thần kinh vùng cổ; các khối u thuộc gốc mô giữa, gồm sarcoma mô mềm, sarcoma cơ vân, và sarcoma xương; và các khối u khác, gồm u sắc tố, bệnh khô da sắc tố, u quá sản sừng, u tinh, ung thư thể nang và teratocarcinoma, và các bệnh ung thư khác đã được xác định là trong đó CD38 được biểu hiện. Tốt hơn là, rối loạn là NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL, hoặc CML, trong đó CD38 được biểu hiện, và các bệnh ung thư khác đã được xác định trong đó CD38 là được biểu hiện mạnh hơn. Theo phương án khác, dược phẩm theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh tự miễn, chẳng hạn như bệnh lupus ban đỏ toàn thân, bệnh viêm khớp dạng thấp, bệnh đa xơ cứng, bệnh Crohn's, viêm loét đại tràng, viêm dạ dày, viêm tuyến giáp Hashimoto, viêm cột sống dính khớp, viêm mạch globulin lạnh trong máu liên quan đến viêm gan C, viêm não khu trú mãn tính, bong rộp dạng pemphigus, bệnh máu khó đông A, viêm cầu thận tăng sinh màng, hội chứng Sjogren, viêm đa cơ ở trẻ vị thành niên và người lớn, viêm đa cơ ở người lớn, mày đay mãn tính, viêm xơ gan ống mật, ban xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát, viêm dây thần kinh tủy, bệnh loạn năng tuyến giáp dạng Grave, bong rộp dạng pemphigus, viêm cầu thận tăng sinh màng, hội chứng Churg-Strauss, và bệnh hen suyễn. Theo phương án khác, dược phẩm nêu trên được đề cập

đến để điều trị các rối loạn khác như là, ví dụ như, thải ghép, chẳng hạn như thải ghép thận, thải ghép gan, thải ghép phổi, thải ghép tim, và thải ghép tủy xương; bệnh kháng lại mô cấy ghép; bệnh lây nhiễm do virus, chẳng hạn như bệnh truyền nhiễm mV, bệnh truyền nhiễm HIV, AIDS, v.v.; và bệnh ký sinh trùng, chẳng hạn như bệnh nhiễm khuẩn giardias, bệnh lỵ do amip gây nên, bệnh sán máng, và các bệnh khác như được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Tương tự, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự tăng trưởng các quần thể tế bào được chọn gồm các tế bào đích, hoặc mô chứa các tế bào đích, với lượng kháng thể, đoạn kháng thể hoặc thể liên hợp kháng thể hữu hiệu của sáng chế, hoặc kháng thể, đoạn kháng thể hoặc chất có tác dụng chữa bệnh gồm thể liên hợp gây độc tế bào, hoặc đơn lẻ hoặc kết hợp với các chất gây độc tế bào hoặc chất trị liệu khác. Theo phương án được ưu tiên, chất trị liệu khác là một chất đối vận của yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố mô (TF), protein C, protein S, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), heregulin, protein kích thích đại thực bào (MSP) hoặc yếu tố tăng trưởng nội mô tim (VEGF), hoặc chất đối vận của thụ thể đối với yếu tố sinh trưởng biểu bì (EGF), yếu tố sinh trưởng nguyên bào sợi (FGF), yếu tố sinh trưởng tế bào gan (HGF), yếu tố mô (TF), protein C, protein S, yếu tố sinh trưởng có nguồn gốc từ tiểu cầu (PDGF), heregulin, protein kích thích đại thực bào (MSP), hoặc yếu tố tăng trưởng nội mô tim (VEGF), bao gồm thụ thể HER2, thụ thể HER3, c-MET, và thụ thể tyrosin kinaza khác. Theo phương án được ưu tiên, chất trị liệu khác là một chất hướng đến các cụm kháng nguyên biệt hóa (CD), bao gồm CD3, CD14, CD19, CD20, CD22, CD25, CD28, CD30, CD33, CD36, CD40, CD44, CD52, CD55, CD59, CD56, CD70, CD79, CD80, CD103, CD134, CD137, CD138, và CD152. Theo phương án được ưu tiên, chất trị liệu khác là chất trị liệu hóa học hoặc điều biến miễn dịch.

Phương pháp ức chế sự phát triển của các quần thể tế bào được chọn lọc có thể được thực hiện trong điều kiện in vitro, in vivo, hoặc ex vivo. Như được sử dụng ở đây, "ức chế sự phát triển" có nghĩa là làm chậm sự phát triển của tế bào, làm giảm

khả năng tồn tại của tế bào, dẫn đến làm chết tế bào, phân giải tế bào và gồm việc làm chết tế bào, hoặc trong thời gian ngắn hoặc trong thời gian kéo dài.

Các ví dụ sử dụng trong điều kiện in vitro gồm các phương pháp điều trị chứng tự rụng của tủy xương trước khi mảnh ghép của chúng xâm nhập vào bệnh nhân để diệt bệnh hoặc các tế bào ác tính; việc điều trị cho tủy xương trước khi thực hiện ghép cơ quan để tiêu diệt hiệu quả các tế bào T và ngăn ngừa bệnh chống chủ do truyền máu (GVHD); việc điều trị nuôi cấy tế bào để tiêu diệt toàn bộ các tế bào trừ khi các biến thể được mong đợi mà không biểu hiện kháng nguyên đích; hoặc để tiêu diệt các biến thể mà biểu hiện kháng nguyên không được mong muốn.

Các điều kiện không lâm sàng in vitro sử dụng dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật.

Các ví dụ lâm sàng ex vivo sử dụng để loại bỏ các tế bào khối u hoặc các tế bào lympho từ tủy xương trước khi ghép tự thân trong điều trị ung thư hoặc trong điều trị các bệnh tự miễn, hoặc để loại bỏ các tế bào T và các tế bào lympho khác từ sự tự rụng hoặc nguồn tủy xương hoặc mô trước khi cấy ghép để ngăn ngừa bệnh chống chủ do truyền máu (GVHD). Việc điều trị có thể được thực hiện như sau. Tủy xương được thu từ bệnh nhân hoặc cá thể khác và sau đó được ủ trong môi trường chứa huyết thanh để môi trường đó được bổ sung chất gây độc tế bào theo sáng chế. Nồng độ nằm trong khoảng từ khoảng 10 μ M đến 1pM, trong thời gian khoảng từ 30 phút đến khoảng 48 giờ ở nhiệt độ khoảng 37°C. Các điều kiện chính xác về nồng độ và thời gian ủ, tức là, liều lượng, dễ dàng được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này. Sau khi ủ, các tế bào tủy xương được rửa bằng môi trường chứa huyết thanh và được đưa trở lại vào bệnh nhân bằng cách tiêm tĩnh mạch theo các phương pháp đã biết. Trong các điều kiện ở đó bệnh nhân được nhận các liệu pháp điều trị khác như là chuỗi phương thức hóa trị liệu hoặc chiếu xạ toàn thân giữa thời điểm thu nhận tủy và tiêm nhắc lại các tế bào đã xử lý, các tế bào tủy đã xử lý được bảo quản lạnh trong nitơ lỏng bằng cách sử dụng thiết bị hóa chất chuẩn.

Đối với việc dùng các thử nghiệm lâm sàng in vivo, kháng thể, đoạn kháng thể liên kết epitop, hoặc thể liên hợp gây độc tế bào theo sáng chế sẽ được cung cấp làm các dung dịch mà được kiểm tra độ vô khuẩn và hàm lượng nội độc tố. Các ví dụ của

các quy trình sử dụng thể liên hợp gây độc tế bào phù hợp như sau. Các thể liên hợp được dùng hàng tuần trong bốn tuần với liều lượng lớn theo đường tĩnh mạch mỗi tuần. Liều lượng lớn được sử dụng nằm trong khoảng từ 50 đến 100ml dung dịch muối thông thường cho từ 5 đến 10ml albumin huyết thanh người có thể được bổ sung vào. Các liều lượng sẽ từ 10 μ g đến 100mg trên mỗi lần áp dụng, theo đường tĩnh mạch (nằm trong khoảng từ 100ng đến 1mg/kg mỗi ngày). Tốt hơn nữa là, liều lượng sẽ nằm trong khoảng từ 50 μ g đến 30mg. Tốt nhất là, liều lượng nằm trong khoảng từ 1mg đến 20mg. Sau bốn tuần điều trị, bệnh nhân có thể tiếp tục được nhận chế độ điều trị hàng tuần cơ bản. Các quy trình lâm sàng đặc hiệu đối với đường sử dụng, các tá dược, các chất hòa tan, các liều lượng, thời gian, v.v. có thể được xác định bởi người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật như các bảo đảm về trạng thái lâm sàng.

Chẩn đoán

Các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể của sáng chế cũng được sử dụng để phát hiện ra CD38 trong mẫu sinh học in vitro hoặc in vivo. Trong một phương án, các kháng thể kháng CD38 theo sáng chế được sử dụng để xác định hàm lượng của CD38 ở mô hoặc trong các tế bào thu được từ mô. Trong phương án được ưu tiên, mô là mô bị nhiễm bệnh. Trong một phương án được ưu tiên của phương pháp, mô là một khối u hoặc mẫu sinh thiết của chúng. Trong một phương án được ưu tiên của phương pháp, mô hoặc mẫu sinh thiết của chúng được cắt bỏ lần đầu tiên từ bệnh nhân, và sau đó các hàm lượng của CD38 ở mô hoặc mẫu sinh thiết có thể được xác định bằng xét nghiệm miễn dịch bằng các kháng thể hoặc các đoạn kháng thể theo sáng chế. Trong một phương án được ưu tiên khác, hàm lượng của CD38 được xác định trên mẫu mô hoặc mẫu sinh thiết của chúng, các mẫu này có thể là mẫu lạnh hoặc cố định. Phương pháp tương tự có thể được sử dụng để xác định các đặc tính khác của protein CD38, như là hàm lượng bề mặt tế bào của protein CD38, hoặc sự khu trú trong tế bào của protein CD38.

Phương pháp được mô tả ở trên có thể được sử dụng để chẩn đoán bệnh ung thư ở đối tượng đã biết hoặc bị nghi ngờ có bệnh ung thư, trong đó hàm lượng của CD38 được xác định ở các bệnh nhân nêu trên được so sánh với hàm lượng của CD38 ở các đối tượng tham chiếu bình thường hoặc chuẩn. Sau đó, phương pháp nêu trên có thể được sử dụng để xác định liệu khối u biểu hiện CD38, mà có thể đề xuất rằng khối u sẽ đáp ứng tốt với việc điều trị bằng các kháng thể, các đoạn kháng thể hoặc các thể liên hợp kháng thể theo sáng chế. Tốt hơn là, khối u là NHL, BL, MM, B-CLL, ALL, TCL, AML, HCL, HL, hoặc CML, trong đó CD38 được biểu hiện, và các bệnh ung thư khác chưa được xác định trong đó CD38 được biểu hiện chủ yếu.

Ngoài ra, sáng chế đề cập đến các kháng thể đơn dòng, kháng thể nhân hóa và các đoạn liên kết epitop của chúng mà ngoài ra được đánh dấu để sử dụng trong nghiên cứu hoặc các ứng dụng chẩn đoán. Trong các phương án được ưu tiên, phương pháp đánh dấu là sử dụng đồng vị phóng xạ, chất huỳnh quang, nhóm mang màu, chất tạo hình ảnh hoặc ion kim loại.

Phương pháp để chẩn đoán cũng được đề cập đến trong đó các kháng thể được đánh dấu nêu trên hoặc các đoạn liên kết epitop của chúng được áp dụng cho đối tượng bị nghi ngờ mắc bệnh ung thư hoặc bệnh viêm nhiễm hoặc bệnh tự miễn, và sự phân bố của các chất đánh dấu trong cơ thể đối tượng được xác định hoặc định lượng.

Kit

Sáng chế cũng bao gồm các bộ kit, ví dụ, gồm thể liên hợp gây độc tế bào và bản hướng dẫn sử dụng được mô tả để sử dụng thể liên hợp gây độc tế bào để làm chết các kiểu tế bào cụ thể. Bản hướng dẫn sử dụng có thể gồm các hướng dẫn sử dụng các thể liên hợp gây độc tế bào in vitro, in vivo hoặc ex vivo.

Cụ thể, bộ kit sẽ có một bộ phận chứa thể liên hợp gây độc tế bào. Thể liên hợp gây độc tế bào có thể ở dạng đông khô, dạng lỏng, hoặc dạng khác có thể được hoàn thiện để đưa vào trong bộ kit. Ngoài ra, bộ kit cũng có thể chứa các thành phần cần thiết để thực hiện phương pháp được mô tả trong bản hướng dẫn sử dụng trong bộ kit,

dung dịch được khử trùng này để tái tạo bột đông khô, các chất phụ gia để kết hợp với thể liên hợp gây độc tế bào trước khi áp dụng cho bệnh nhân, và các công cụ mà hỗ trợ trong việc áp dụng thể liên hợp này cho bệnh nhân.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Sáng chế được mô tả bằng các ví dụ tham chiếu sau, mà chỉ để minh họa, và không có mục đích giới hạn sáng chế.

Ví dụ 1

Các kháng thể CD38 ở chuột

Các tế bào 300-19, dòng tế bào tiền-B thu được từ chuột Balb/c (M. G. Reth et al. 1985, *Nature*, 317: 353-355), biểu hiện ổn định một hàm lượng cao của CD38 ở người được sử dụng để tạo đáp ứng miễn dịch cho chuột Balb/c VAF. Chuột được gây miễn dịch dưới da bằng khoảng 5×10^6 CD38 biểu hiện các tế bào 300-19 cho mỗi con chuột trong thời gian 2-3 tuần một lần bằng các phương thức gây miễn dịch chuẩn được sử dụng trong ImmunoGen, Inc. Các con chuột được gây miễn dịch được tăng liều lượng khác của kháng nguyên trong thời gian ba ngày trước khi được thay thế để phát sinh tế bào lai. Lách từ chuột được tập hợp theo các phương thức chuẩn và được đặt vào giữa hai lần vi khuẩn, được đóng băng thành các bản vi mô huyền phù tế bào đơn lẻ trong môi trường RPMI-1640. Các tế bào lách được tạo hạt nhỏ, rửa, và làm tan chảy bằng các tế bào u tủy ở chuột P3X63Ag8.653 (J. F. Kearney et al. 1979, *J Immunol*, 123: 1548-1550) bằng cách sử dụng polyetylen glycol-1500 (Roche 783 641). Các tế bào được làm tan chảy được huyền phù hóa lại trong môi trường chọn lọc RPMI-1640 chứa hypoxanthin-aminopterin-thymidin (HAT) (Sigma H-0262) và được chọn để phát triển trong các đĩa nuôi cấy đáy tròn 96 giếng (Coming-Costar 3596, 200 μ L huyền phù tế bào mỗi giếng) ở nhiệt độ 37°C (5% CO₂). Sau năm ngày ủ, 100 μ L phần nuôi cấy trên bề mặt được loại bỏ khỏi mỗi giếng và thay thế bằng 100 μ L môi trường RPMI-1640 chứa hypoxanthin-thymidin (HT) bổ sung (Sigma H-0137). Tiếp tục ủ ở nhiệt độ 37°C (5% CO₂) cho tới khi các

dòng tế bào lai vô tính sẵn sàng để sàng lọc kháng thể. Các kỹ thuật khác của phương pháp gây miễn dịch và sản xuất tế bào lai cũng có thể được sử dụng, gồm các phương pháp được mô tả trong ấn phẩm: J. Langone và H. Vunakis (Eds., *Methods in Enzymology*, Vol. 121, "Immunochemical Techniques, Part I"; Academic Press, Florida) và E. Harlow và D. Lane ("Antibodies: A Laboratory Manual"; 1988; Cold Spring Harbor Laboratory Press, New York).

Bằng cách phân loại tế bào bằng các chất huỳnh quang đã hoạt hóa (fluorescence activated cell sorting – FACS) sử dụng thiết bị Becton Dickinson FACSCalibur hoặc a FACSArray, các phần nuôi cấy bề mặt từ tế bào lai được sàng lọc (bằng FITC hoặc PE- liên hợp IgG kháng huyết thanh kháng chuột) để tiết ra các kháng thể đơn dòng ở chuột mà liên kết với CD38 biểu hiện các tế bào 300-19, nhưng không biểu hiện các tế bào 300-19 gốc. Các dòng tế bào lai vô tính mà được kiểm tra là dương tính được biểu hiện dưới dòng, và isotyp của mỗi kháng thể kháng CD38 không biểu hiện được phân loại bằng cách sử dụng các chất phản ứng đồ hình sẵn có (Roche 1493027). Tổng 29 kháng thể dương tính đối với CD38 liên kết được tinh chế bằng sắc ký Protein A hoặc G bằng cách sử dụng các phương thức chuẩn và sau đó được mô tả nhiều hơn.

Ví dụ 2

Đặc tính liên kết của các kháng thể kháng CD38

Các biểu đồ tần suất FACS chứng minh sự liên kết của các kháng thể kháng CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 với các tế bào 300-19 biểu hiện CD38 và sự vắng mặt của liên kết với các tế bào 300-19 gốc được thể hiện trong Fig.1. Kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 (10nM) được ủ trong thời gian 3 giờ hoặc với các tế bào 300-19 biểu hiện CD38 hoặc với các tế bào 300-19 gốc ($1-2 \times 10^5$ tế bào trên mỗi mẫu) trong 100 μ L môi trường RPMI-1640 băng lạnh được bổ sung bằng huyết thanh dê bình thường 2%. Sau đó, các tế bào được tạo hạt nhỏ, rửa, và ủ trong thời gian 1 giờ trong băng bằng thể liên hợp FITC với kháng thể IgG kháng chuột ở dê (Jackson Laboratory, 100 μ L, 6 μ g/ml môi trường RPMI-1640 lạnh được bổ sung bằng huyết thanh dê bình

thường 2%). Các tế bào được tạo hạt một lần nữa, rửa, huyền phù hóa lại trong 200 μ L PBS chứa formaldehyt 1%, và được phân tích bằng cách sử dụng tế bào kế FACSCalibur flow với phần mềm CellQuest (BD Biosciences).

Các biểu đồ tần suất FACS của các tế bào 300-19 biểu hiện CD38 được ủ với 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 cho thấy độ lệch huỳnh quang mạnh, so với biểu đồ đối chiếu âm tính tương ứng (các tế bào chỉ được ủ với thể liên hợp FITC, kháng thể IgG kháng chuột ở dê) (Fig.1). Cũng không có tín hiệu độ lệch huỳnh quang được phát hiện khi các tế bào gốc 300-19 được ủ với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này. Các kết quả tương tự thu được khi biểu đồ đối chiếu dương tính kháng thể kháng CD38, AT13/5 (Serotec, MCA1019) được sử dụng.

Độ lệch huỳnh quang mạnh cũng quan sát được khi các tế bào lympho Ramos (ATGC CRL 1596) được ủ với 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 (Fig. 1). Các giá trị đối với các hằng số phân hủy biểu kiến (KD) của 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 để liên kết với các tế bào Ramos được đánh giá từ các biểu đồ phân tích FACS được bộc lộ trong Fig.2, sử dụng phương pháp hồi quy không tuyến tính đối với các biểu đồ hình xichma tương ứng với liều lượng (GraphPad Prizm, version 4, software, San Diego, CA). Các giá trị tương ứng là như sau: 0,10nM, 0,10nM, 0,12nM, 0,16nM, 0,11nM, và 3,03 nM.

Ví dụ 3

Phương pháp quy nạp cơ chế gây chết tế bào theo chương trình của các tế bào lympho Ramos và các tế bào lympho Dauli, bằng các kháng thể 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 và 38SB39.

Các kháng thể kháng CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 gồm cơ chế gây chết tế bào theo chương trình của các dòng tế bào lympho Ramos và các dòng tế bào Dauli (ATCC CCL-213) và dòng tế bào đa u tủy MOLP-8 (DSMZ ACC 569). Mức độ của cơ chế gây chết tế bào theo chương trình được xác định bằng phân tích FACS sau khi nhuộm bằng các thể liên hợp FITC của Annexin V

(Biosource PHN1018) và bằng TO-PRO-3 (Invitrogen T3605). Annexin V liên kết phosphatidylserin trên bề mặt ngoài nhưng không liên kết trên bề mặt trong của hai lớp màng tế bào của các tế bào nguyên vẹn. Ở các tế bào bình thường, khỏe mạnh, phosphatidylserin được biểu hiện trên bề mặt trong của hai lớp màng, và quá trình biến đổi của phosphatidylserin từ lớp bên trong đến lớp bên ngoài của màng plasma là một trong số các tín hiệu có thể phát hiện được sớm nhất của cơ chế gây chết tế bào theo chương trình. Theo cách đó liên kết của Annexin V là tín hiệu để thực hiện quy nạp cơ chế gây chết tế bào theo chương trình. TO-PRO-3 là monome của axit nucleic cyanin mà có thể chỉ xuyên qua màng plasma khi màng bị xuyên thủng, như xuất hiện trong giai đoạn cuối của cơ chế gây chết tế bào theo chương trình.

Các tế bào phát triển theo hàm mũ được phủ khoảng 2×10^5 tế bào/ml trong các đĩa 24 giếng trong môi trường RMPI-1640 được bổ sung bằng huyết thanh bào thai bò 10% (FBS), 2mM L-glutamin, và 50 μ g/ml gentamycin (có nghĩa là môi trường RMPI-1640 hoàn chỉnh dưới đây). Các tế bào được phát triển như bình thường trong môi trường RMPI-1640 hoàn chỉnh, trừ khi được quy định theo cách khác. Các tế bào được ủ với các kháng thể kháng CD38 (10 nM) trong thời gian 24 giờ ở nhiệt độ 37°C trong không khí ẩm chứa 5% CO₂. Sau đó các tế bào được tạo hạt nhỏ, rửa hai lần bằng 500 μ L PBS, huyền phù hóa lại trong 100 μ L đệm liên kết (được đề cập trong bộ kit Annexin V-FITC), chứa 5 μ L Annexin V-FITC, và được ủ trong thời gian 15 phút trong băng 15. Sau đó, 400 μ L đệm gắn kết và TO-PRO-3 (tối nồng độ cuối là 1 μ M) được bổ sung vào hỗn hợp, và tế bào được liên kết huỳnh quang của FITC và TO-PRO-3 được xác định ngay lập tức FACS. Bốn trăm biến có được tập hợp cho mỗi mẫu. Các biểu đồ dạng điểm đối với huỳnh quang của T TO-PRO-3 (FL4-H; trục-y) và huỳnh quang của Annexin V-FITC (FL1-H; trục-x) được tạo thành bằng cách sử dụng phần mềm CellQuest.

Các kết quả được thể hiện trong FIG.3 và 4. FIG.3 thể hiện ví dụ của biểu đồ dạng điểm nêu trên đối với các tế bào con sau thời gian ủ 24 giờ với các kháng thể kháng CD38 khác nhau. Các phần trăm trung bình của các tế bào dương tính với Annexin V (gồm cả các tế bào TO-PRO-3 dương tính và các tế bào âm tính) từ các

mẫu bản sao được xác định từ các biểu đồ này và được thể hiện trong FIG.4. Ngạc nhiên là, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 đã thể hiện các hoạt tính gây tế bào chết mạnh. Hơn 30% các tế bào Daudi được bộc lộ với kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể này là Annexin V dương tính, so với chỉ khoảng 6% các tế bào không được xử lý (FIG.3 và 4A). 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 đã bộc lộ ít nhất 2,4-fold các hoạt tính gây chết mạnh hơn (24% sau khi loại trừ giá trị đối chiếu không được xử lý) so với các kháng thể CD38 ở chuột của lĩnh vực trước đó được thử nghiệm ở nồng độ tương tự là 10nM, (AT13/5, OKT10, IB4, và SUN-4B7, nhỏ hơn 10% Annexin V-dương tính sau khi loại trừ giá trị đối chiếu không được xử lý) và hai kháng thể kháng CD38 khác được tạo ra trong phòng thí nghiệm của sáng chế, (38SB7 và 38SB23, không cao hơn đối chiếu không được xử lý, tức là khoảng 6% Annexin V-dương tính) (FIG. 4A). AT13/5 được mua từ Serotec (MCA1019), và OKT10 được sản xuất và tinh chế từ tế bào lai (ATCC CRL-8022). IB4 và SUN-4B7 là tặng phẩm từ Prof. F. Malavasi, University of Turin, Italy. Tương tự, các kháng thể kháng CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 đã thể hiện ít nhất 3,5-fold hoạt tính tiền gây chết mạnh hơn trên dòng tế bào lai khác, nhánh (7% hoặc nhiều hơn Annexin-V-dương tính sau khi loại trừ giá trị đối chiếu không được xử lý) hơn hoặc so với các kháng thể kháng CD38 ở chuột của lĩnh vực kỹ thuật trước đó, AT13/5, OKT10, IB4, và SUN-4B7, hoặc so với hai kháng thể kháng CD38 mới khác, 38SB7 và 38SB23 (nhỏ hơn 2% Annexin V-dương tính sau khi loại trừ giá trị đối chiếu không được xử lý) (FIG. 4B). Cuối cùng, các kháng thể kháng CD38, 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 D38 thể hiện hoạt tính tiền gây chết mạnh trên nhiều dòng tế bào u tủy MOLP-8 (FIG.4C). Xấp xỉ 50% các tế bào MOLP-8 được xử lý bằng các kháng thể này là Annexin V-dương tính, so với khoảng 39% các tế bào không được xử lý. Trong sự tương phản, việc điều trị bằng kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể CD38 ở chuột của lĩnh vực kỹ thuật trước đó, AT13/5, OKT10, IB4, và SUN-4B7, hoặc hai kháng thể kháng CD38 mới khác, 38SB7 và 38SB23 kết quả là không làm tăng trong phần các tế bào gây chết.

Ví dụ 4

Sự nhân dòng và giải trình tự các chuỗi nhẹ và các chuỗi nặng các kháng thể kháng CD38

Kháng thể 38SB19.

Việc tổng hợp ARN từ các tế bào lai tạo ra kháng thể 38SB19

Các quá trình điều chế của toàn bộ ARN thu được 5×10^6 tế bào lai, tạo ra các kháng thể 38SB19 bằng việc sử dụng bộ kit Qiagen's RNeasy miniprep. Trong một thời gian ngắn, 5×10^6 tế bào được viên lại và được huyền phù hóa trở lại trong 350 μL đệm RLT (chứa β -mecaptoetanol 1%).

Huyền phù được đồng nhất hoá bằng cách cho chảy qua một cột có kích thước 21,5 và bơm mạnh từ 10 - 20 lần hoặc cho đến khi nó không thể dính hơn được nữa. Etanol (350 μL etanol 70% trong nước) được thêm vào thể đồng nhất, hỗn hợp này được khuấy trộn nhiều. Dung dịch được chuyển vào một cột quay, đổ vào một ống cỡ 2-ml và quay $>8000 \times g$ trong 15 giây. Cột được rửa hai lần với 500 μL đệm RPE, sau đó chuyển vào một ống mới và tách rửa với 30 μL RNase không có nước và quay trong 1 phút. Phân tách rửa (30 μL) được đổ trở lại vào cột trong một giây 1 phút. Một phần 1/3 của 30 μL phân tách rửa được pha loãng với nước và sử dụng thiết bị hấp thụ UV ở 260 nm để định lượng ARN.

Sự tổng hợp cADN với phản ứng phiên mã ngược (RT)

Khoảng biến thiên các kháng thể 38SB19 cADN được sinh ra từ toàn bộ ARN bằng cách sử dụng bộ kit Invitrogen's SuperscriptII. Phác đồ của bộ kit được theo sau một cách chặt chẽ, việc sử dụng trên 5 μg của toàn bộ RNA từ Qianeasy mini preps. Trong một thời gian ngắn, ARN, 1 μL các môi ngẫu nhiên, và 1 μL dNTP trộn lẫn được mang nên trên 12 μL với RNase không vô trùng được hoà tan trong nước và được ủ ở 65°C trong 5 phút. Hỗn hợp sau đó được đổ vào nước đá trong ít nhất 1 phút. Tiếp đó 4 μL của 5 x đệm phản ứng, 2 μL 0,1 M DTT, và 1 μL RNaseOUT được thêm vào và hỗn hợp được ủ ở 25°C trong 2 phút trong một máy quay vòng nhiệt MJ Research. Máy quay vòng nhiệt được tạm dừng khi 1 μL enzym SuperscriptII được thêm vào và sau đó bắt đầu trở lại thêm 10 phút ở 25°C trước khi chuyển lên 55°C

trong 50 phút. Phản ứng được làm nóng mà không cần có sự cấp nhiệt đến 70°C trong 15 phút và ARN được loại bỏ bằng cách thêm 1 μ L RNase H và ủ ở 37°C trong 20 phút.

Các phản ứng thoái hoá PCR

Cách tiến hành cho vòng phản ứng thoái hoá PCR đầu tiên trên cADN nhận được từ các tế bào hybridoma dựa trên cơ sở các phương pháp được mô tả trong tài liệu Wang et al. (2000) và Co et al. (1992). Các môi cho vòng này (Bảng 2) chứa các vị trí hạn chế để thuận tiện cho sự nhân dòng vào trong các plasmit pBluescriptII.

Các thành phần của phản ứng PCR (Bảng 3) được trộn lẫn trong nước đá trong các ống PCR có vách mỏng và sau đó được chuyển vào máy quay vòng nhiệt MJ research trước khi gia nhiệt và tạm dừng ở 94°C. Các phản ứng được tạo thành bằng cách sử dụng một chương trình nhận được từ Wang et al. 2000 như sau:

tên: Wang45

94°C 3:00 phút

94°C 0:15 giây

45°C 1:00 phút

72°C 2:00 phút

Goto 2 29 lần

72°C 6:00 phút

4°C mãi mãi

kết thúc

Các hỗn hợp phản ứng PCR sau đó được xảy ra sau đó trên gel agarosa 1% chảy thấp, các dải từ 300 đến 400 bp được cắt bỏ, quá trình tinh chế sử dụng các cột Zymo DAN nhỏ, và gửi đến Agencourt sinh học để xếp chuỗi. Các môi PCR tương ứng 5' và 3' được sử dụng để giải trình tự môi để sinh ra 38SB19 vùng biến đổi cADNs từ cả hai phương diện.

Sự nhân dòng trên trình tự đầu 5'

Từ khi các môi suy biến được sử dụng để sinh sản vô tính 38SB19 của vùng biến đổi các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của trình tự cADN thay đổi trình tự đầu 5', việc thêm các chuỗi nỗ lực được mong muốn là chuỗi tiếp tục được giải mã. Chuỗi cADN

chuẩn bị bằng các phương pháp được mô tả ở trên được sử dụng để tìm kiếm NCBI IgBlast site (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/igblast/>) cho chuỗi germlin ở chuột từ chuỗi 38SB19 đã nhận được. Mỗi PCR được thiết kế (Bảng 3) để ủ để bắt đầu mạch của kháng thể ở chuột do đó một phản ứng PCR mới có thể sinh ra tiếp tục vùng biến đổi cADN, không thay đổi bởi các môi PCR. Các phản ứng PCR, sự tinh chế các dải, và việc giải trình tự được tạo thành như đã được mô tả ở trên.

Phân tích peptit cho trình tự được xác nhận

Trình tự cADN được xác nhận cho vùng biến đổi được liên kết với germlin có chứa trình tự của vùng cố định để đạt được chiều dài đầy đủ của trình tự kháng thể cADN. Trọng lượng phân tử của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ sau đó được tính toán và so sánh với trọng lượng phân tử thu được bằng các phân tích LC/MS ở kháng thể 38SB19 ở chuột.

Bảng 4 đưa ra tính toán nói chung từ trình tự cADN cho 38SB19 LC và HC với nhau với giá trị đo được bằng LC/MS. Trọng lượng phân tử đo được là phù hợp với trình tự cADN với cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ 38SB19.

Ví dụ 5

Sự biểu hiện tái tổ hợp của các kháng thể hu38SB19

Vùng biến đổi trình tự hu38SB19 được được tối ưu hoá đơn vị mã và được tổng hợp bởi công nghệ sinh học Blue Heron. Các trình tự ở bên sườn bằng cách hạn chế sự định vị của các enzym để nhân dòng theo thứ tự với trình tự tương ứng không đổi trong cả chuỗi đơn và chuỗi đôi sau đó biểu hiện các plasmit. Vùng biến đổi của chuỗi nhẹ được sinh sản vô tính trên các vị trí EcoRI và BsiWI trên cả các plasmit ps38SB19LCZvLO và ps38SB19v1.00 (Fig. 5A và 5C). Vùng biến đổi của chuỗi nặng là sinh sản vô tính trên các vị trí HindIII và ApaI của cả hai plasmit ps38SB19HCNvLO và ps38SB19v1.00 (Fig. 5B và 5C). Các plasmit này có thể được sử dụng để biểu diễn hu38SB19 trong hoặc nhất thời hoặc chuyển nhiễm ổn định trong tế bào của động vật có vú. Vật truyền biểu hiện tương tự vẽ lên được sử dụng để tạo ra các kháng thể lai khác và kháng thể nhân hóa.

Sự chuyển nhiễm ngắn để biểu diễn hu38SB19 trong các tế bào HEK-293T đã được tạo ra sử dụng chai thuốc thử CaPO₄ từ BD biosciences. Sự cung cấp các

protocols được biến đổi nhẹ nhàng để tăng cường hiệu quả biểu hiện. Trong một thời gian ngắn, 2×10^6 tế bào HEK-293T được được bọc trên 10 cm mô nuôi cấy được phủ trên một tấm polyetylenimin (PEI) 24 giờ trước khi chuyển nhiễm. Sự chuyển nhiễm bắt đầu bằng việc rửa các tế bào với PBS và thay thế môi trường bằng 10 ml DMEM (Invitrogen) với 1% IgG FBS siêu thấp (Hyclone). Dung dịch A (10 μ g ADN, 86,8 μ L dung dịch Ca^{2+} , và thêm lên trên 500 μ L nước H_2O) được thêm từng giọt vào dung dịch B trong khi được tạo xoáy. Hỗn hợp được ủ ở RT trong 1 phút và 1 ml của hỗn hợp được thêm nhỏ giọt vào mỗi 10 cm tấm. Khoảng 16 giờ sau khi chuyển nhiễm, môi trường được thay thế bằng 10 ml DMEM mới với 1% IgG FBS siêu thấp. Khoảng 24 giờ sau 2 mM natri butylrat được thêm vào mỗi 10 cm tấm. Sự chuyển nhiễm được thu sau 4 ngày.

Phần nổi trên bề mặt điều chế được giống với cấu trúc của Protein A sắc ký bằng cách thêm 1/10 thể tích đệm 1 M Tris/HCl, pH 8,0. Điều chỉnh pH phần nổi trên bề mặt được lọc qua màng 0,22 μ m và nạp thẳng vào cột Protein A Sepharose (HiTrap Protein A HP, 1 ml, Amersham Biosciences) được cân bằng với đệm liên kết (PBS, pH 7,3). Một cột trước Q-Sepharose (10 ml) được nối theo hướng ngược với cột Protein A trong suốt quá trình mẫu được nạp vào để loại bỏ các chất bẩn từ các vật liệu của tế bào như ADN. Sau khi mẫu được nạp xong, cột trước được tháo bỏ và cột Protein A định hướng được đảo ngược để rửa và rửa giải. Cột được rửa với đệm liên kết đến khi một ranh giới ổn định được tạo thành với không hấp thụ ở 280 nm. Kháng thể được rửa giải với đệm axit axetic 0,1M chứa 0,15 M NaCl, độ pH 2,8, tốc độ chảy 0,5 ml/phút. Một phần khoảng 0,25 ml được gom lại và được trung hoà bằng cách thêm 1/10 thể tích Tris/HCl 1M, pH 8,0. Pic thành phần được thẩm tách lại hai lần qua đệm bằng và kháng thể được tinh chế được định lượng bằng cách hấp thụ trên OD₂₈₀- đã được người hoá và các kháng thể lai có thể tinh chế sử dụng cột Protein G với các biện pháp giảm nhẹ khác nhau.

Tất cả các kháng thể khảm và các kháng thể kháng CD38 nhân hóa đã được mô tả được thể hiện và được tinh chế bằng các biện pháp tương tự như được mô tả ở trên.

Ví dụ 6

Cơ chế gây độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC) của các kháng thể kháng thể kháng CD38 khảm.

Từ một số kháng thể kháng CD-38 đã được giới thiệu ở trên có hoạt tính ADCC và/hoặc CDC như các kháng thể khảm hoặc kháng thể nhân hóa với vùng biến đổi IgG1 ở người (J. H. Ellis et al. 1995, *J Immunol*, 155: 925-937; F. K. Stevenson et al. 1991, *Blood*, 77: 1071-1079; WO 2005/103083), các kháng thể khảm 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39, gồm có vùng biến đổi của chuột và khoảng cố định IgG1/IgKappa ở người, được tạo thành và được kiểm tra hoạt động ADCC và/hoặc CDC. Ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31, và ch38SB39 được kiểm tra đầu tiên ADCC bằng cách sử dụng các tế bào Ramos làm tế bào đích và các tế bào diệt tự nhiên ở người (NK) là các tế bào tác động. Phân tích Lactat dehydrogenaza (LDH) giải phóng được sử dụng để đo sự tiêu tế bào (R. L. Shields et al., 2001, *J Biol Chem*, 276: 6591-6604).

Các tế bào NK đầu tiên được phân lập từ máu người (từ một người cho bình thường; được mua từ Research Blood Components, Inc., Brighton, MA bằng cách sử dụng một thay đổi quy ước cho NK isolation Kit II (Miltenyi Biotech). Máu được pha loãng 2-3 lần với dung dịch muối Hank's Balanced (HBSS). 25 ml máu pha loãng được phân lớp cẩn thận trong 25 ml Ficoll Paque trong một ống nón 50 ml và được ly tâm ở 400 g trong 45 phút ở 19°C. Các tế bào máu ngoại vi đơn nhân (PBMC) được tích lũy trên mặt phân cánh, được chuyển vào một ống hình nón mới dung tích 50 ml, và rửa một lần với HBSS. PBMC được khuấy đục trở lại trong 2 ml đệm phân lập NK, và sau đó 500 µL Kháng thể-Biotin Cocktail (from the NK-isolation kit, 130-091-152, Miltenyi Biotech) được thêm vào huyền phù tế bào. Kháng thể-Biotin Cocktail chứa các kháng thể biotinylat mà có liên kết với các tế bào bạch cầu, chấp nhận cho các tế bào NK. hỗn hợp được ủ ở 4°C trong 10 phút, và sau đó 1,5 ml đệm phân lập NK (PBS, 0,1% BSA, 1 mM EDTA) và 1 ml các vi hạt kháng Biotin được thêm vào. hỗn hợp tế bào-kháng thể được ủ cùng nhau trong 15 phút ở 4°C. Tiếp đó, các tế bào được rửa một lần với 50 ml đệm phân lập NK và được huyền phù trở lại trong 3 ml đệm phân lập NK. Sau đó, cột MACS LS (trên máy phân ly MACS, Miltenyi Biotech) được rửa trước với 3 ml đệm phân lập NK. Huyền phù tế bào sau

đó được ứng dụng trên cột LS. Dòng chảy (phân chia với các tế bào không đánh dấu) được gom lại vào một bình nón 50 ml mới. Cột được rửa 3 lần với 3 ml đệm phân lập NK. Toàn bộ dòng chảy được tập hợp vào ống giống như vậy và rửa một lần bằng 50 ml đệm phân lập NK. Các tế bào NK được đưa vào 30 ml PMI-1640 được bổ sung với huyết thanh thai bò 5%, 50 µg/ml gentamycin.

Các nồng độ khác nhau của các kháng thể ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31, và ch38SB39 trong phần bổ sung trung gian RPMI-1640 với 0,1% BSA, 20 mM HEPES, độ pH 7,4, và 50 µg/ml gentamycin (chứng tỏ ở dưới như RHBP trung gian) được phân ước (50 µl/giếng) vào một tấm đáy trồng gồm 96 giếng. Các tế bào Ramos đích được huyền phù trở lại 10^6 tế bào/ml trong môi trường RHBP và được thêm vào mỗi giếng (100 µL/giếng) chứa kháng thể pha loãng. Tấm có chứa các tế bào đích và kháng thể pha loãng được ủ trong 30 phút ở 37°C. Các tế bào NK (50 µL/giếng) sau đó được thêm vào các giếng chứa các loại tế bào đích theo tỷ lệ 1 tế bào đích với từ 3 đến 6 tế bào NK. Môi trường RHBP (50 µL/giếng) được thêm vào các giếng kiểm soát với các tế bào NK. Do đó, 20 µL dung dịch Triton X-100 (môi trường RPMI-1640, 10% Triton X-100) được thêm vào 3 giếng chỉ chứa các tế bào đích mà không có kháng thể, để xác định sự giải phóng LDH tối đa có thể thực hiện được. Hỗn hợp được ủ ở 37°C trong 4 giờ, sau đó được ly tâm trong 10 phút ở 1200 rpm, và 100 µL phần nổi trên bề mặt được chuyển cẩn thận vào một tấm đáy phẳng mới gồm 96 giếng. Hỗn hợp phản ứng LDH (100 µL/giếng) từ gây độc tế bào tách Kit (Roche 1 644 793) được thêm vào mỗi giếng và được ủ ở nhiệt độ phòng trong 5-30 phút. Mật độ quang của mẫu được đo ở 490 nm (OD_{490}). Phần trăm phân giải cụ thể của mỗi mẫu được xác định bằng cách gán 100% giá trị phân giải của OD_{490} của các mẫu đã được xử lý Triton X-100 và 0% giá trị phân giải của chỉ các tế bào đích OD_{490} kiểm soát chưa xử lý. Các mẫu chỉ chứa các tế bào NK các tế bào cho dữ liệu OD_{490} không đáng kể.

Khi kiểm tra với các tế bào đích Ramos và bộ phận tác động của tế bào NK, các kháng thể lai kháng thể kháng CD-38 thể hiện hoạt tính ADCC rất có hiệu lực (Fig. 6). Giá trị EC_{50} được đánh giá bằng phương pháp hồi quy không tuyến tính sigmoidal đường cong liều đáp ứng và được tìm thấy như sau: 0,0013 µg/ml cho

ch38SB13, 0,0013 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB18, 0,0018 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB19, 0,0022 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB30, 0,0012 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB31, 0,1132 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB39. Các kháng thể lai kháng thể kháng CD-38 cũng thể hiện hoạt động ADCC có hiệu quả trên LP-1 (DSMZ ACC 41) các tế bào u tủy (các giá trị EC_{50} : 0,00056 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB18; 0,00034 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB19; 0,00024 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB31) (Fig. 7A). Ch38SB19 cũng có hiệu quả làm chết các tế bào lympho Daudi (Fig. 7B), các tế bào NALM-6 B-ALL (DSMZ ACC 128) (Fig. 8A), và các tế bào MOLT-4 T-ALL (ATTC CRL-1582) (Fig. 8B) bằng ADCC, cho thấy kháng thể kháng CD-38 có hoạt tính gây độc tế bào mạnh bất thường cũng có hoạt tính ADCC hiệu quả với các loại u khác nhau có nguồn gốc từ nhiều khối u ác tính. Do đó, một hệ kháng thể không liên kết IgG1 (rituximab, Biogenldec) (Fig. 7A, 8A, và 8B) hoặc mu38SB19 (Fig. 7B) trong cùng mẫu thử nghiệm không có hoạt tính ADCC đáng kể.

Ví dụ 7

Hoạt tính CDC của các kháng thể kháng CD38.

Hoạt tính CDC của ch38SB13, ch38SB18, ch38SB19, ch38SB30, ch38SB31, và ch38SB39 được đo trên cơ sở phương pháp biến đổi đề từ (H. Gazzano-Santoro et al. 1997, *J. Immunol Methods*, 202: 163-171). Bỏ thể ở người được làm khô lạnh huyết thanh bỏ thể người (Sigma-Aldrich S1764) được tái lập với nước tinh khiết vô trùng như được chỉ thị bởi người sản xuất và sau đó pha loãng năm lần trực tiếp với môi trường RHBP trước khi thử nghiệm. Các tế bào đích được tạo huyền phù ở mức 10^6 tế bào/ml trong môi trường RHBP được phân ước vào các giếng của một bản mỏng cấy mô 96-giếng đáy phẳng (50 μL /giếng). Sau đó, 50 μL các kháng thể kháng CD38 có nồng độ khác nhau (từ 10 nM tới 0,001 nM) trong môi trường RHBP được thêm vào (mỗi kháng thể cho một mẫu), sau đó là 50 μL /giếng dung dịch bỏ thể. Tấm sau đó được ủ trong 2 giờ ở 37°C trong không khí ẩm có chứa 5% CO_2 , sau thời gian đó 50 μL tác nhân Alamar Blue of 40% (Biosource DAL1100) pha loãng trong RHBP (10% cuối cùng) được thêm vào mỗi giếng để đo khả năng sống được của các tế bào. Alamar Blue điều chỉnh sự giảm khả năng của các tế bào sống. Tấm được ủ trong vòng 5-18 giờ trong 37°C trước khi đo huỳnh quang (trong một máy đo huỳnh quang tỷ đối, RFU) ở 540/590 nm. Phần trăm các tế bào cụ thể có khả năng

sống được cho mỗi mẫu được xác định bằng các giá trị thí nghiệm chính xác đầu tiên cho nền huỳnh quang bằng cách trừ giá trị nền RFU (các giếng với một môi trường, không có bất kỳ tế bào nào) từ giá trị RFU của mỗi mẫu, và sau đó, chia giá trị RFU đã hiệu chỉnh bằng giá trị đã hiệu chỉnh RFU của các mẫu tế bào chưa xử lý.

Khi hoạt tính CDC của mẫu các kháng thể kháng CD38 được thử nghiệm với các tế bào Raji-IMG sử dụng bổ thể người ở độ pha loãng cuối cùng 5%, các kháng thể kháng CD38 thể hiện hoạt tính CDC rất có hiệu lực (Fig. 9). Raji-IMG là các tế bào nhận được từ các tế bào Raji (ATCC CCL-86) và biểu thị mức độ thấp hơn của chất ức chế màng bổ thể CD55 và CD59. Giá trị EC_{50} được đã được đánh giá bằng cách hồi quy không tuyến tính từ sigmoidal đường cong liều đáp ứng được thể hiện trên Fig. 8. và theo sau đây: 0,005 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB13, 0,0101 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB18, 0,028 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB19, 0,020 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB30, 0,010 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB31, và 0,400 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB39. Các kháng thể kháng CD38 cũng thể hiện hiệu quả hoạt tính CDC nhằm vào LP-1 các tế bào u tuỷ (giá trị EC_{50} : 0,032 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB18; 0,030 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB19; 0,043 $\mu\text{g/ml}$ cho ch38SB31), trong khi các kháng thể lai không liên kết hạn chế IgG1 (rituximab, Biogenldec) không có bất kỳ hoạt động CDC nào (Fig. 10). Khi các kháng thể kháng CD38 được kiểm tra trên tế bào lympho Daudi, khác với kháng thể kháng CD-38 khác nhau về hoạt động CDC của chúng (Fig. 11). Trong khi các tế bào Daudi đặc biệt có khả năng sống thấp hơn 15% sau khi chúng được ủ với 1,25 $\mu\text{g/ml}$ ch38SB19 với sự có mặt của bổ thể, ở đây chỉ sự giảm bớt bờ trên các tế bào đặc biệt có khả năng phát triển sau khi các tế bào này được ủ với ch38SB18 hoặc ch38SB39 (1,25 $\mu\text{g/ml}$ hoặc ở nồng độ cao hơn) với sự có mặt của bổ thể (phần đặc biệt có khả năng phát triển tương ứng là 85% và 91%). Do đó, chỉ giảm rất ít phần có khả năng phát triển được quan sát thấy khi các tế bào Daudi được ủ với 1,25 $\mu\text{g/ml}$ hoặc ở nồng độ cao hơn của ch38SB13, ch38SB30, và ch38SB31 với sự có mặt của bổ thể (phần đặc biệt có khả năng phát triển lần lượt là 65%, 45%, và 53%).

Ví dụ 8

Liên kết ái lực và gây độc tế bào, các hoạt tính ADCC và CDC của các kháng thể kháng CD38 nhân hóa.

Hai phiên bản nhân hóa của 38SB19 (hu38SB19 v1.00 và v1.20) và 38SB19 dạng khảm cho thấy ái lực liên kết khi được thử nghiệm với các tế bào Ramos có các giá trị K_0 lần lượt bằng 0,23 nM, 0,25 nM, và 0,18 nM (Fig. 12A). Ái lực liên kết của các kháng thể khảm và các kháng thể nhân hóa 38SB19 cũng được so sánh trong thử nghiệm liên kết, trong đó khả năng của chúng để cạnh tranh với liên kết của biotinylated kháng thể 38SB19 được tính toán. Kháng thể 38SB19 ở chuột có nhãn Biotin (3×10^{-10} M) được trộn với nhiều hu38SB19, hu38SB19 v1.00, hoặc hu38SB19 v1.20 cô đặc. Hỗn hợp kháng thể được ủ với các tế bào Ramos, và lượng liên kết 38SB19 ở chuột có nhãn Biotin hóa đến các tế bào được tính toán với FITC-liên kết streptavidin bởi phân tích FACS. Hu38SB19 v1.00, hu38SB19 v1.20, và ch38SB19 so với sự liên kết của miễn dịch 38SB19 (Fig. 12B). Khi ch38SB19, hu38SB19 v1.00 và hu38SB19 v1.20 (10^{-8} đến 10^{-11} M) được so sánh đối với khả năng giảm cơ chế gây chết tế bào theo chương trình của tế bào Daudi, chúng cho thấy hoạt tính gây độc tế bào (Fig. 13). Ngoài ra, hu38SB19 v1.00 và v1.20 cũng biểu hiện ADCC tương tự như ch38SB19 (Fig. 14) và tiềm năng của CDC tương tự như ch38SB19 trong Raji-IMG và tế bào LP-1 (Fig. 15). Hu38SB19 v1.00 cũng biểu hiện hoạt tính CDC tương tự ch38SB19 trong dòng tế bào của bệnh bạch cầu thể lympho cấp tính tế bào T DND-41 (DSMZ 525) (Fig. 15). Hu38SB19 v1.00 thí nghiệm thêm về khả năng tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong một bộ đa dạng của dòng tế bào (Fig. 16). Việc điều trị bằng hu38SB19 v1.00 (10^{-8} M) đã làm tăng nhanh Annexin V- tế bào dương tính B tế bào lymphoma dòng tế bào SU-DHL- 8 (DSMZ ACC 573) (từ 7% kiểm soát không được điều trị đến 97% trong hu38SB19- tế bào được điều trị) và NU-DUL-1 (DSMZ ACC 579) (từ 10% kiểm soát không được điều trị đến 37% trong hu38SB19- được điều trị tế bào) và T-ALL dòng tế bào DND-41 (từ 7% in kiểm soát không được điều trị đến 69% trong hu38SB19- tế bào được điều trị). Ngoài ra, điều trị bằng hu38SB19 v1.00 (10^{-8} M) đã làm gia tăng phần Annexin V-các tế bào dương tính trong dòng tế bào của bệnh bạch cầu thể lympho tế bào B JVM-13 (DSMZ ACC 19) (từ 8% trong đối chứng không được điều trị đến 17% trong hu38SB19- tế bào được điều trị) và trong tế bào bệnh bạch cầu dòng tế bào

HC-1 (DSMZ ACC 301) (từ 6% trong đối chứng không được điều trị đến 10% trong hu38SB19- tế bào được điều trị).

Tương tự, hai phiên bản của nhân hóa 38SB31 (hu38SB31 v1,1 và v1.2) và 38SB31 biểu hiện khả năng liên kết ái lực khi được thử nghiệm với các tế bào Ramos có giá trị K_D lần lượt bằng 0,13 nM, 0,11 nM, và 0,12 nM. Khả năng liên kết ái lực của kháng thể 38SB31 dạng khảm và nhân hóa cũng được đề cập trong thí nghiệm liên kết cạnh tranh, như được mô tả ở trên và thể hiện một cách tương tự. Hu38SB31v1.1 ngoài ra được thí nghiệm khả năng tạo ra cơ chế gây chết tế bào theo chương trình trong một vài dòng tế bào. Kháng thể nhân hóa thể hiện hoạt tính gây độc tế bào tương tự ch38SB31 với tế bào Ramos, Daudi, Molp-8 và SU-DHL-8. Ngoài ra, hu38SB31 v1.1 cũng biểu hiện hoạt tính tương tự ADCC và CDC như ch38SB31 trong các dòng tế bào này.

Ví dụ 9

Hiệu quả của 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31 và 38SB39 in vivo.

Hoạt tính kháng khối u in vivo của 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, và 38SB39 được điều tra sự sống sót các mẫu khối u ở người trong những con chuột (giống cái CB.17 SCID) được tạo lên bằng tế bào thể lympho Ramos. Những con chuột cái CB.17 SCID được ghép với 2×10^6 Các tế bào Ramosin 0,1 mL môi trường huyết thanh tự do thông qua tĩnh mạch ở đuôi. 7 ngày sau khi cấy ghép mô tế bào, những con chuột được chỉ ngẫu nhiên thành 7 nhóm dựa trên dựa trên trọng lượng cơ thể. Có 10 con chuột mỗi nhóm, trừ nhóm được điều trị 38SB31, gồm 6 con, và 38SB39- nhóm được điều trị, gồm 8 con chuột. Các kháng thể được đưa vào tĩnh mạch của chuột với liều lượng 40 mg/kg, hai lần một tuần, trong ba tuần liên tiếp, bắt đầu 7 ngày sau khi cấy tế bào. Những con chuột nay bị chết hoặc liệt chân trong lượng cơ thể giảm hơn 20% so với lúc chưa điều trị, hoặc những con chuột này yếu đến mức không ăn và uống nước được. Việc điều trị bằng 38SB13, 38SB18, 38SB19, 38SB30, 38SB31, hoặc 38SB39 làm tăng đáng kể khả năng sống sót của chuột được điều trị PBS (Fig. 17). Sự sống sót của động mạch dây thần kinh ở chuột được điều trị là 22 ngày và của kháng thể-nhóm được điều trị từ 28 đến 33 ngày.

Hoạt tính kháng u in vivo của mu38SB19 và hu38SB19 được nghiên cứu thêm nữa ngoài những mẫu khối u ở người trong những con chuột thiếu khả năng tự miễn dịch. Đối với mẫu sống sót lymphoma, những con chuột được cấy ghép với 5×10^6 tế bào Daudis trong 0,1 mL dung dịch huyết thanh tự do qua ven ở đuôi. Nghiên cứu được tiến hành như được mô tả ở trên. Việc điều trị bằng mu38SB19 hoặc hu38SB19 làm tăng đáng kể khả năng sống sót của chuột được điều trị PBS (Fig. 18). Khả năng sống sót của động mạch dây thần kinh của chuột được điều trị PBS là 22 ngày, trong khi sự sống sót của động mạch dây thần kinh của kháng thể-chuột được điều trị là 47 ngày.

Đối với mẫu khối u đa tủy NCI-H929, chuột SCID được cấy ghép hằng ngày với 10^7 tế bào. Khi các khối u có thể thấy được ở ngày thứ 6, những con chuột này được ngẫu nhiên chia thành nhóm gồm 10 con theo trọng lượng cơ thể và điều trị kháng thể được bắt đầu. Kháng thể hu38SB19 hoặc kháng thể kiểm soát IgGI không liên kết hóa học (rituximab, Biogenldec) được đưa vào tĩnh mạch với liều lượng 40 mg/kg, hai lần một tuần, trong ba tuần liên tiếp. Khối lượng khối u được giám sát và những con chuột này bị chết nếu các khối u này đạt mm^3 về kích cỡ hoặc chết hoại. Nhóm PBS được điều trị đạt đến khối lượng khối u 1000 mmm^3 ở ngày thứ 89, nhóm kháng thể kiểm soát IgGI hóa học ở ngày thứ 84 (Fig. 19). Điều trị bằng hu38SB19 ngăn hoàn toàn sự phát triển của khối u trong toàn bộ 10 con chuột. Trái lại, chỉ hai con trong nhóm được điều trị PBS và ba con trong nhóm kháng thể đối chứng dạng khảm IgGI biểu hiện sự hồi quy khối u.

Đối với mẫu khối u đa tủy MOLP-8, chuột SCID được cấy ghép hằng ngày với 10^7 tế bào. Khi các khối u được thấy ở ngày thứ 4, những con chuột này được ngẫu nhiên chia thành nhóm gồm 10 con theo trọng lượng cơ và kháng thể điều trị được bắt đầu. Các kháng thể hu38SB19 và mu38SB19 hoặc kháng thể kiểm soát hóa học IgGI được đưa vào tĩnh mạch với liều lượng 40 mg/kg, hai lần một tuần, trong ba tuần liên tiếp. khối lượng khối u được giám sát và các con chuột bị chết nếu các khối u đạt 2000 mm^3 về kích cỡ hoặc chết hoại. Nhóm được điều trị PBS đạt đến khối lượng khối u của 500 mmm^3 ở ngày thứ 22, nhóm kháng thể kiểm soát hóa học IgGI ở ngày thứ 23 (Hình. 20). Không khối u nào trong những nhóm này bị thoái bộ. Trái

lại, điều trị bằng hu38SB19 hoặc mu38SB19 dẫn đến thoái bộ khối u trong 8 của 10 hoặc 6 của 10 con chuột, một cách tương ứng.

Các bảng:

Bảng 1:

Dư lượng bề mặt khung chuỗi nhẹ mu38SB19 và các dư lượng tương tự ở cùng vị trí Kabat trong kháng thể 1,69 ở người. Dư lượng là khác nhau và do đó được thay đổi trong kháng thể hu38SB19 là trong những hộp màu hồng. Dư lượng có dấu sao (*) bị đột biến trở lại thành phần dư lượng mu38SB19 trong một hoặc nhiều biến thể hu38SB19.

Dư lượng bề mặt khung chuỗi nhẹ mu38SB19 và dư lượng tương ứng trong kháng thể 1,69 ở người		
Vị trí Kabat	mu38SB19	1,69
1	D	D
3	V	V
5*	T	A
9	L	K
10	S	F
15	L	V
18	P	R
40	P	P
41	G	G
42	Q	Q
45	R	K
57	G	G
60	D	D
67	A	S
80	A	A
81	E	E
107	K	K
108	R	R

Bảng 1B:

Dư lượng bề mặt khung chuỗi nặng mu38SB19 và dư lượng tương ứng ở cùng vị trí Kabat trong kháng thể 1,69 ở người. Dư lượng còn lại là khác nhau và do đó được thay đổi kháng thể hu38SB19 là trong những hộp màu hồng.

Dư lượng bề mặt khung chuỗi nặng mu38SB19 và dư lượng tương ứng trong kháng thể 1,69 ở người
--

Vị trí Kabat	mu38SB19	1,69
1	Q	Q
3	Q	Q
5	V	Q
9	A	A
11	V	L
13	K	R
14	P	P
19	K	K
23	K	K
28	T	T
41	P	P
42	G	G
43	Q	Q
61	Q	Q
62	K	K
64	Q	K
65	G	G
73	K	K
74	S	S
82B	S	S
84	S	S
85	E	E
106	Q	Q
113	S	S

Bảng 2.

Chất môi dùng để làm giảm phản ứng PCR dựa trên những chất của Wang et al, 2000 trừ HindKL dựa trên Co et al. 1992. Những cơ sở được xác định như sau: H=A+T+C, S=g+C, Y=C+T, K= G+T, M=A+C, R=A+g, W=A+T, V = A+C+G.

Môi	Trình tự
BamlgG1 (SEQ ID NO. 73)	GGAGGATCCATAGACAGATGGGGGTGTCGTTTTG GC
IgG2Abam (SEQ ID NO. 74)	GGAGGATCCCTTGACCAGGCATCCTAGAGTCA
EcoMH1 (SEQ ID NO. 75)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTC
EcoMH2 (SEQ ID NO. 76)	CTTCCGGAATTCSARGTNMAGCTGSAGSAGTCWG G
SacIMK (SEQ ID	GGAGCTCGAYATTGTGMTSACMCARWCTMCA

NO. 77)	
HindKL (SEQ ID NO. 78)	TATAGAGCTCAAGCTTGGATGGTGGGAAGATGGA TACAGTTGGTGC

Bảng 3:

Những hỗn hợp phản ứng PCR ở chuỗi nhẹ và chuỗi nặng để nhân dòng trình tự cADN của vùng biến đổi 38SB19.

Hỗn hợp phản ứng chuỗi nhẹ	Hỗn hợp phản ứng chuỗi nặng
5 µl 10 X chất đệm phản ứng PCR (Roche)	5 µl 10 X PCR chất đệm phản ứng PCR (Roche)
4 µl 10mM hỗn hợp dNTP (2,5mM mỗi hỗn hợp)	4 µl 10mM hỗn hợp dNTP (2,5mM mỗi hỗn hợp)
2 µl trình tự mẫu (phản ứng RT)	2 µl trình tự mẫu (phản ứng RT)
5 µl 10 µM mỗi trái Sac1MK	2,5 µl 10 µM mỗi trái EcoMH1
5 µl 10 µM mỗi phải HindKL	2,5 µl 10 µM mỗi trái EcoMH2
	5 µl 10 µM mỗi phải BamIlg1
5 µl DMSO	5 µl DMSO
0,5 µl Polymeraza Taq (Roche)	0,5 µl Polymeraza Taq (Roche)
23,5 µl nước cất vô khuẩn	23,5 µl nước cất vô khuẩn
50 µl Tổng cộng	50 µl Tổng cộng

Bảng 4:

Chất môi của trình tự đầu 5' ở chuột được dùng cho phản ứng PCR vòng thứ hai của 38SB19. Chất môi đầu 3' là giống với những chất được sử dụng trong phản ứng lần đầu tiên từ khi chúng được đưa đến các trình tự của vùng cố định tương ứng.

Môi	Trình tự
Chuỗi nhẹ 38SB19 Đầu LC (SEQ ID NO. 79)	ATGGAGTCACAGATTCAGGTC
Chuỗi nặng 38- 19HCLed1 (SEQ ID NO. 80)	TTTTGAATTCCAGTAACTTCAGGTGTCCACTC

Bảng 5:

cADN được tính và LC/MS được đo trọng lượng phân tử của kháng thể 38SB19 ở chuỗi nặng và nhẹ.

	Chuỗi nhẹ			Chuỗi nặng		
	cADN	LC/MS	Chênh lệch	cADN	LC/MS	Chênh lệch
Mu38SB19	23735	23736	1	48805	48826	21

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể nhân hóa hoặc tái tạo bề mặt mà gắn kết đặc hiệu CD38, khác biệt ở chỗ, kháng thể là có khả năng làm chết tế bào CD38⁺ bằng cơ chế gây chết tế bào theo chương trình, gây độc tế bào trung gian phụ thuộc kháng thể (ADCC), và gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC), và

trong đó:

kháng thể này bao gồm vùng biến đổi chuỗi nặng có trình tự axit amin biểu hiện bởi nhóm SEQ ID NO: 66 và vùng biến đổi chuỗi nhẹ có trình tự axit amin được chọn từ nhóm SEQ ID NO: 62 và 64.

Fig. 1A Kháng thể IgG-Fluor α

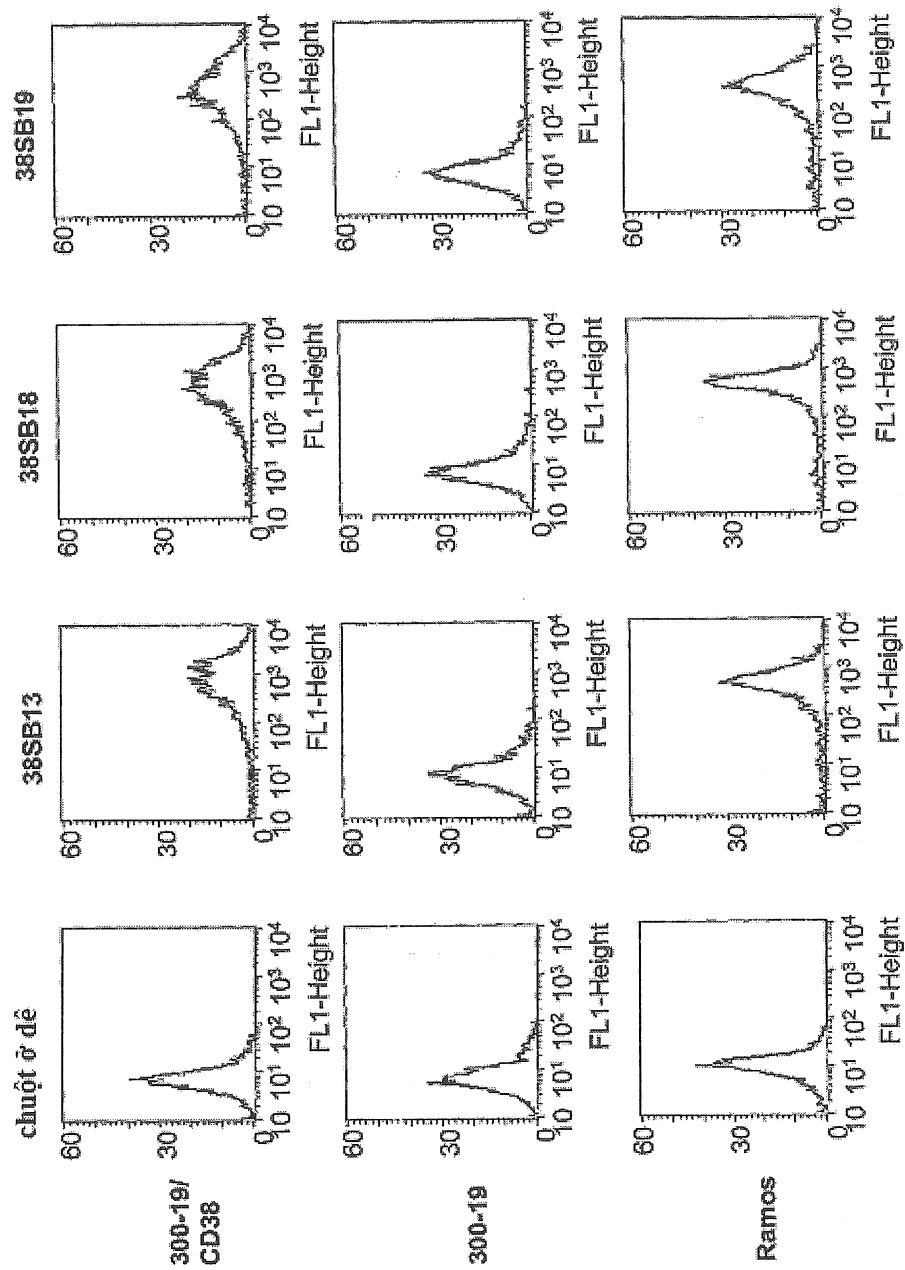


Fig. 1B

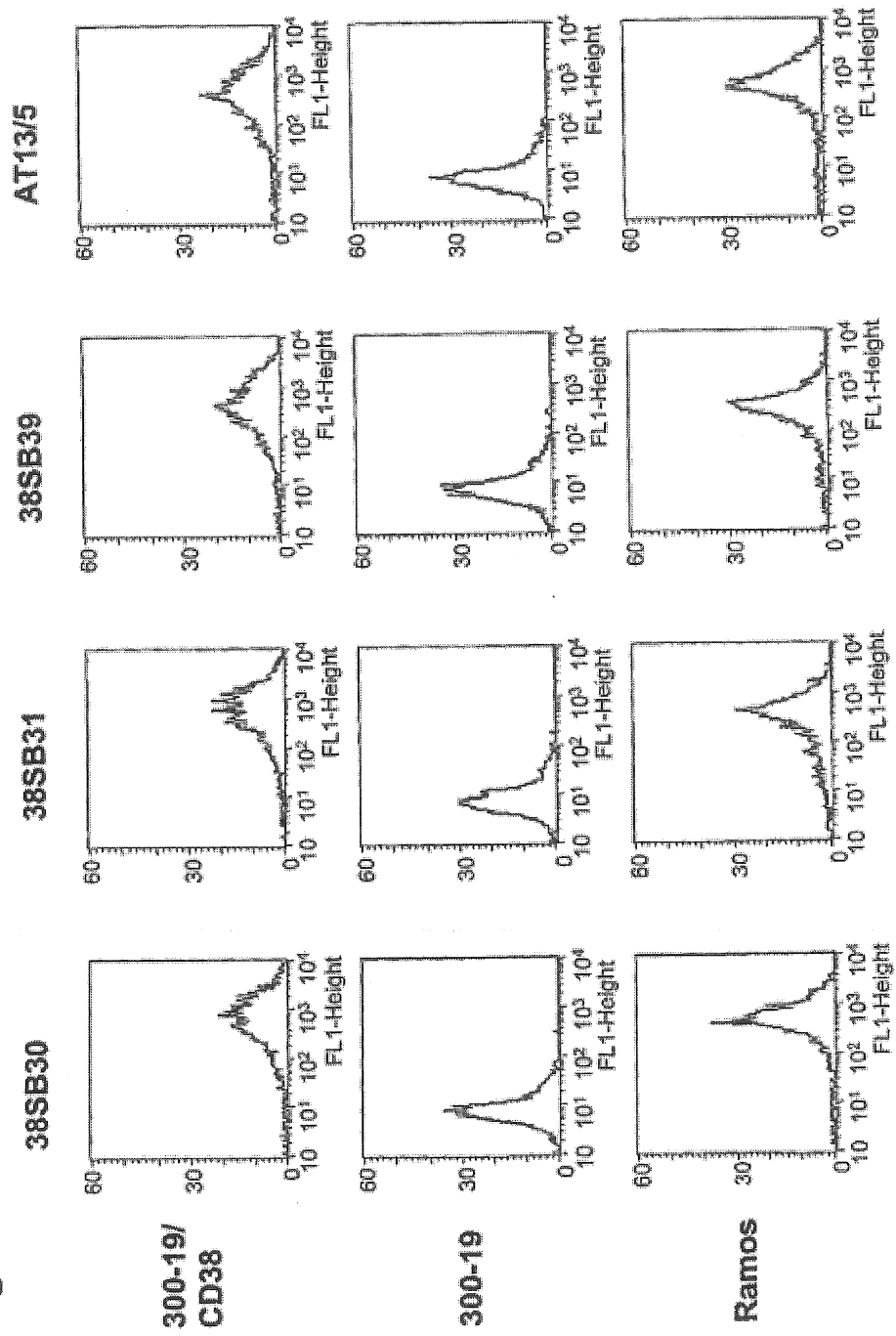
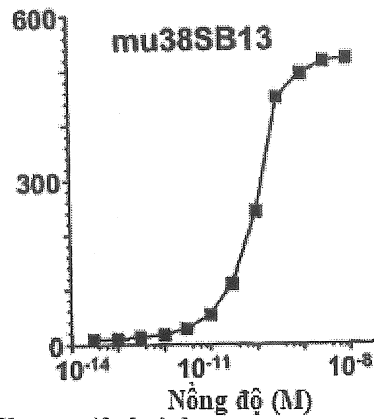
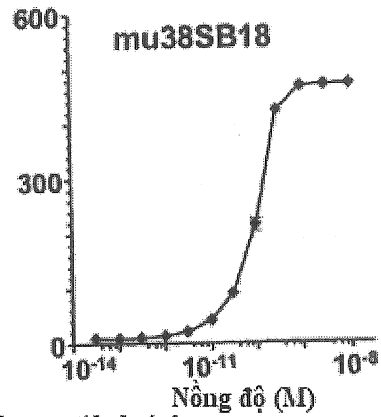


Fig. 2

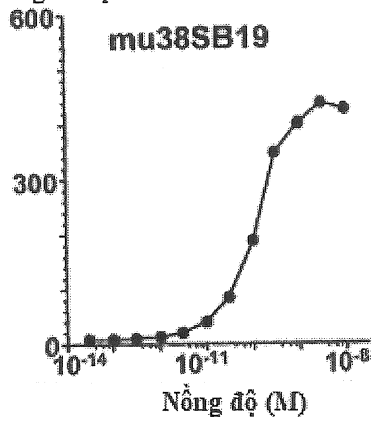
Phương tiện huỳnh quang liên quan



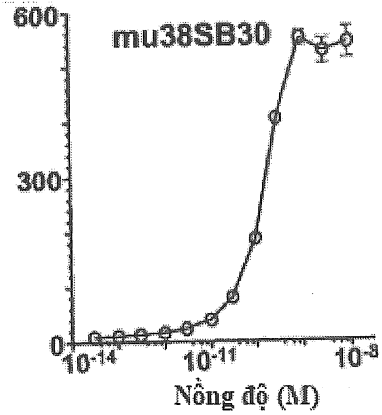
Phương tiện huỳnh quang liên quan



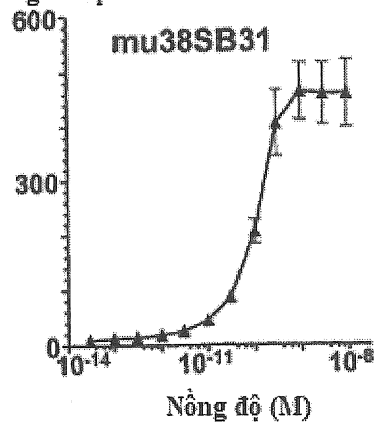
Phương tiện huỳnh quang liên quan



Phương tiện huỳnh quang liên quan



Phương tiện huỳnh quang liên quan



Phương tiện huỳnh quang liên quan

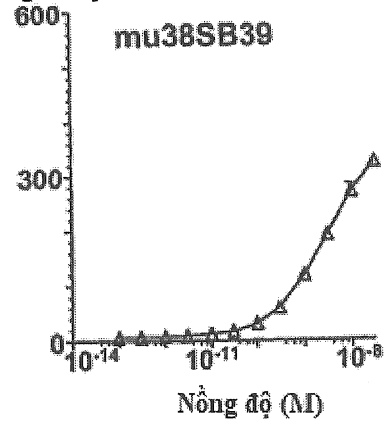


Fig. 3

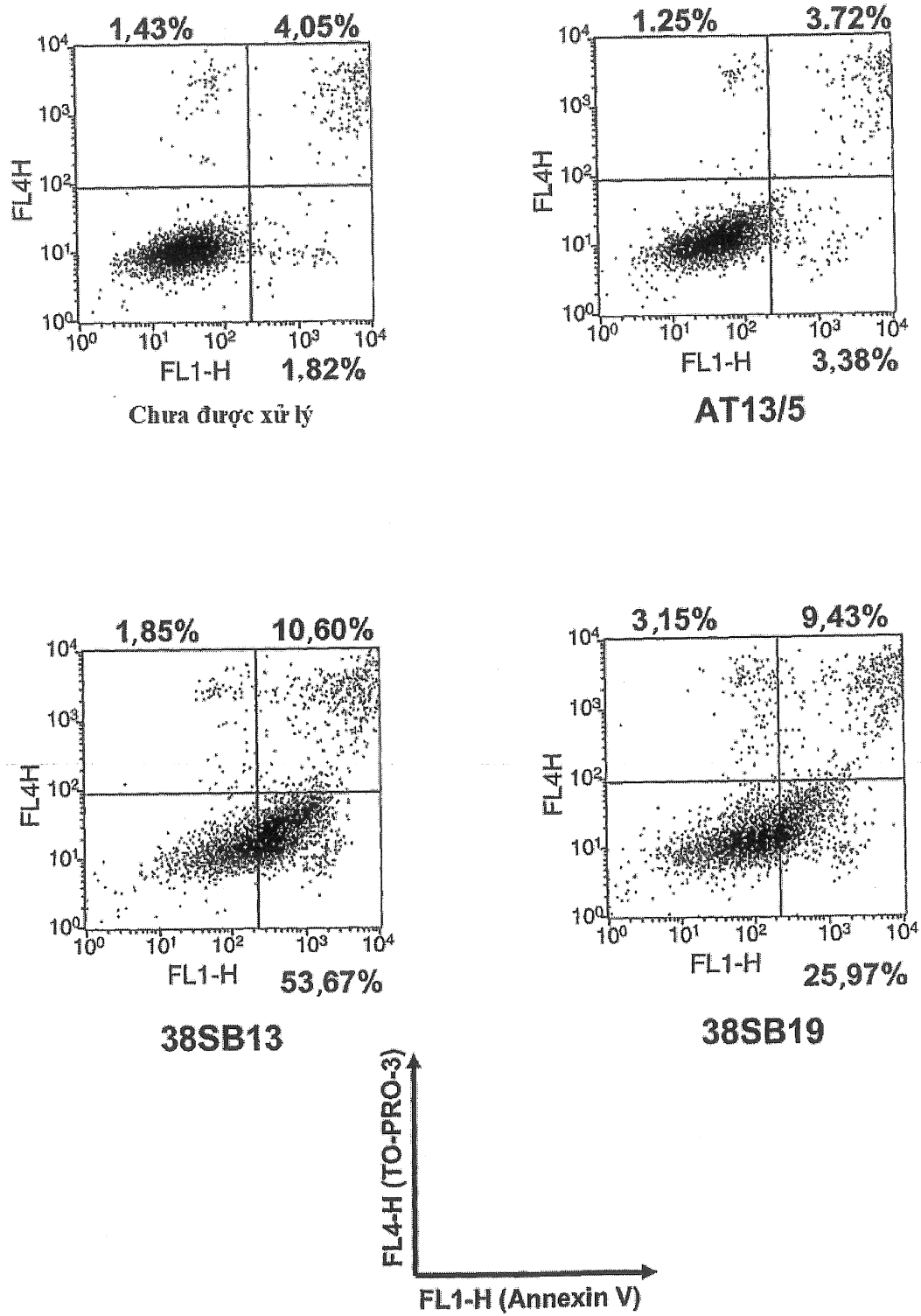


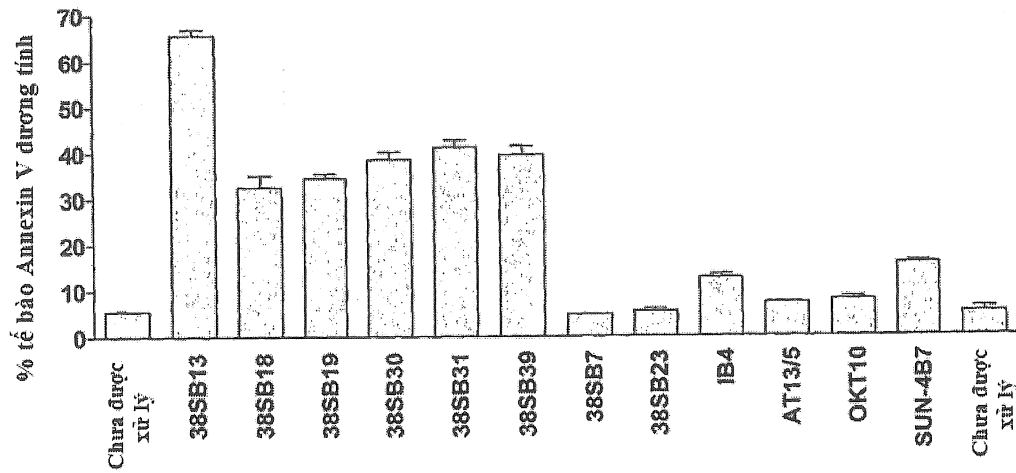
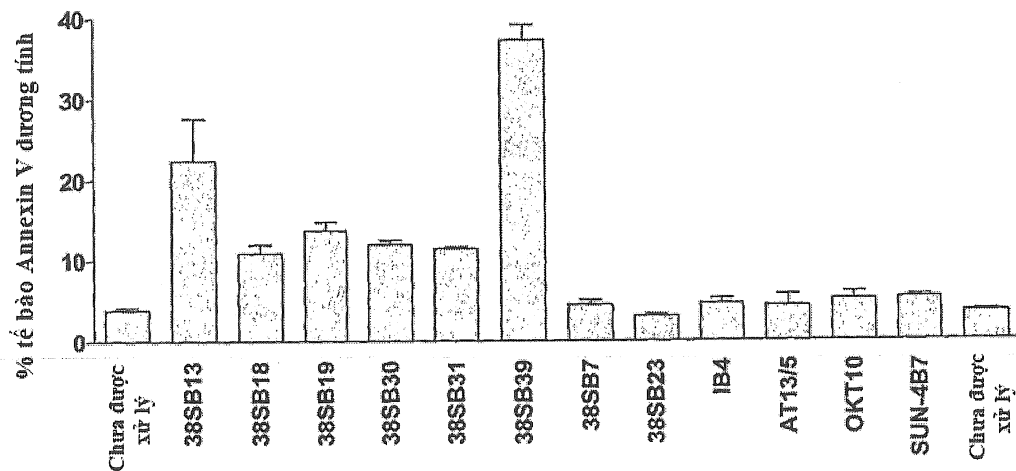
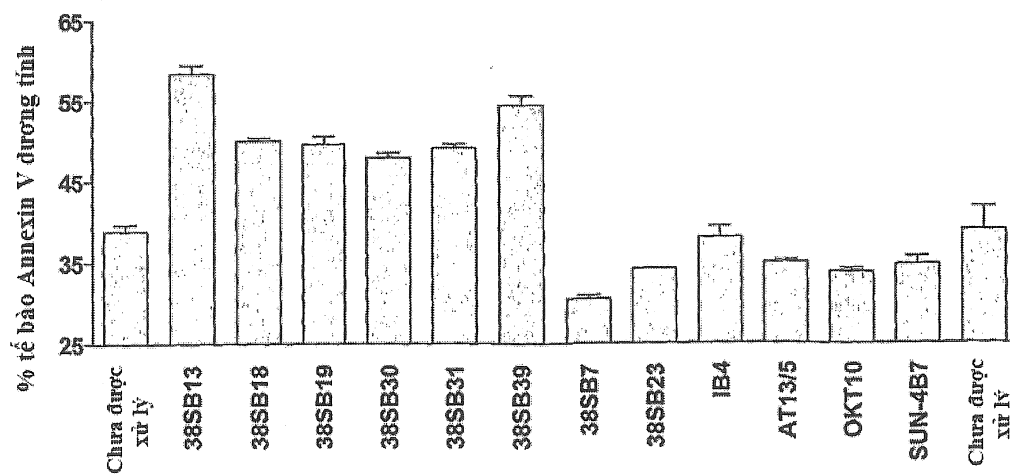
Fig. 4A**Fig. 4B****Fig. 4C**

Fig. 5A

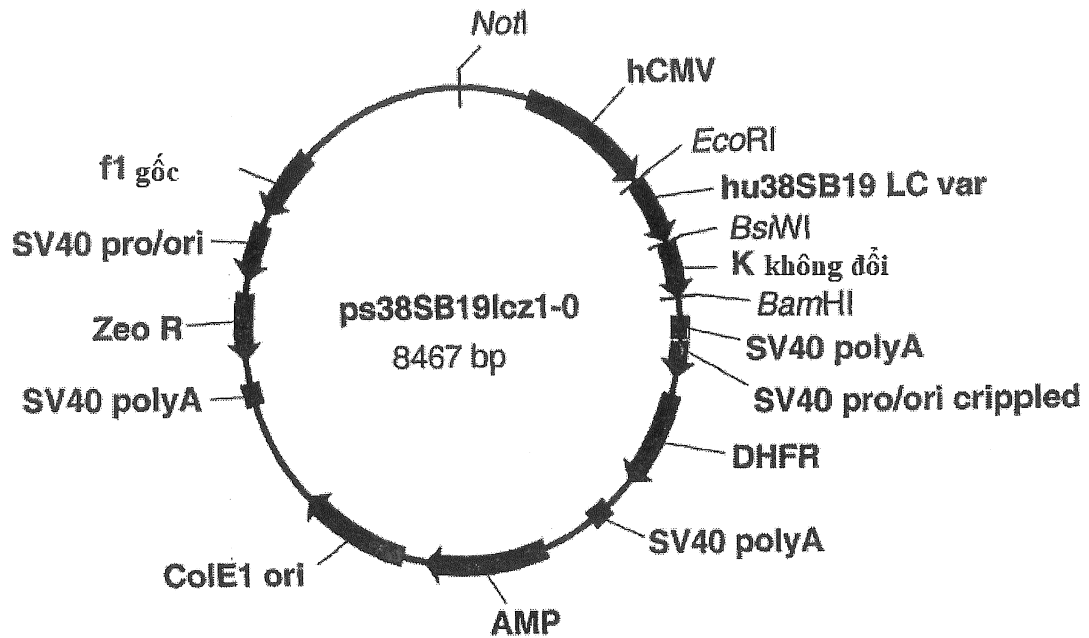


Fig. 5B

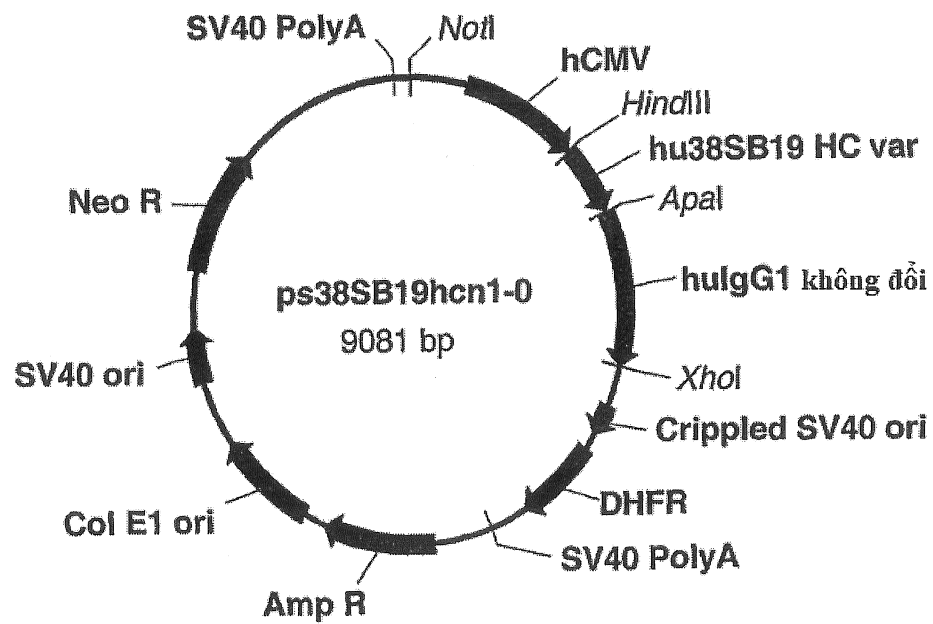


Fig. 5C

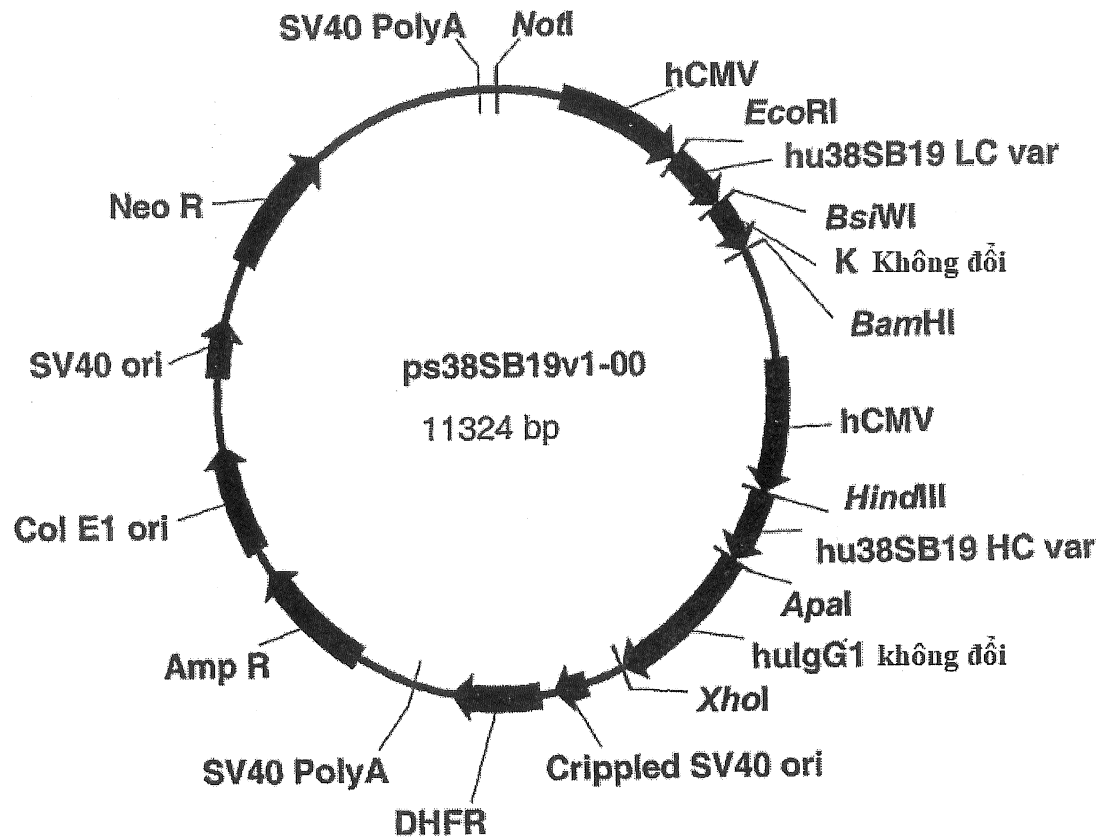


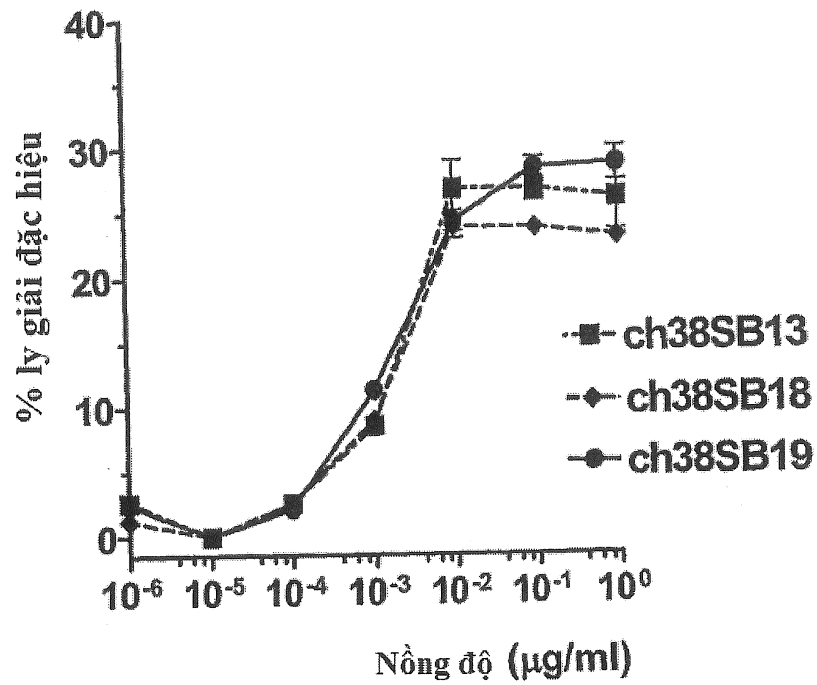
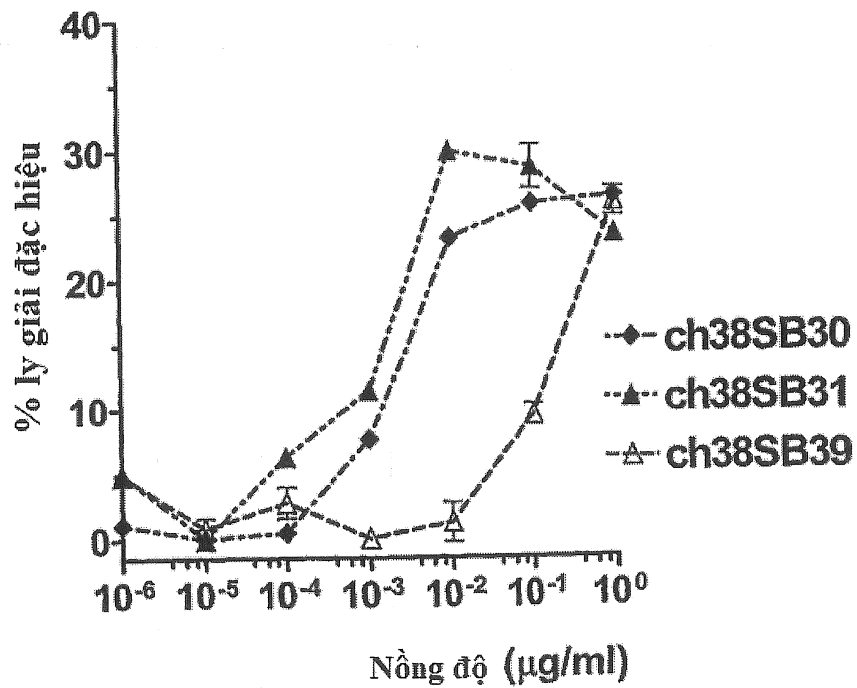
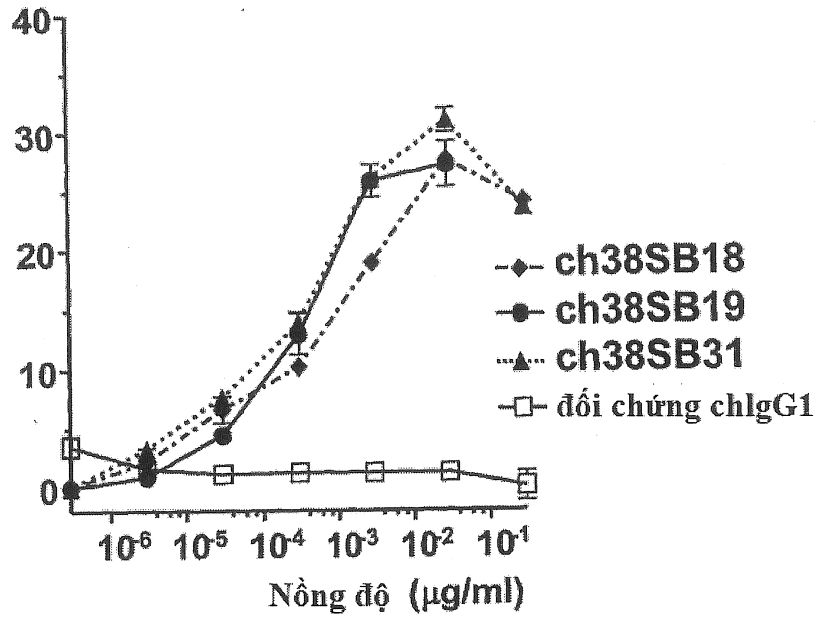
Fig. 6A**Fig. 6B**

Fig. 7A

% ly giải đặc hiệu

**Fig. 7B**

% ly giải đặc hiệu

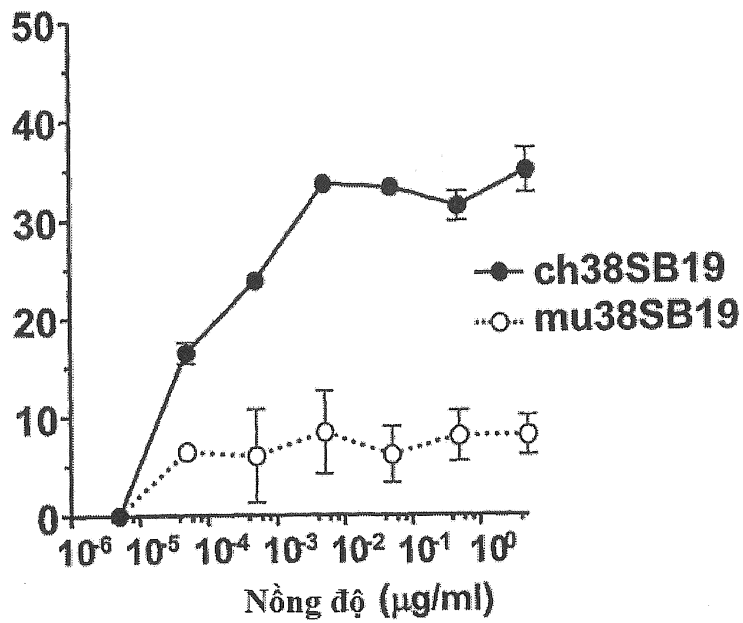
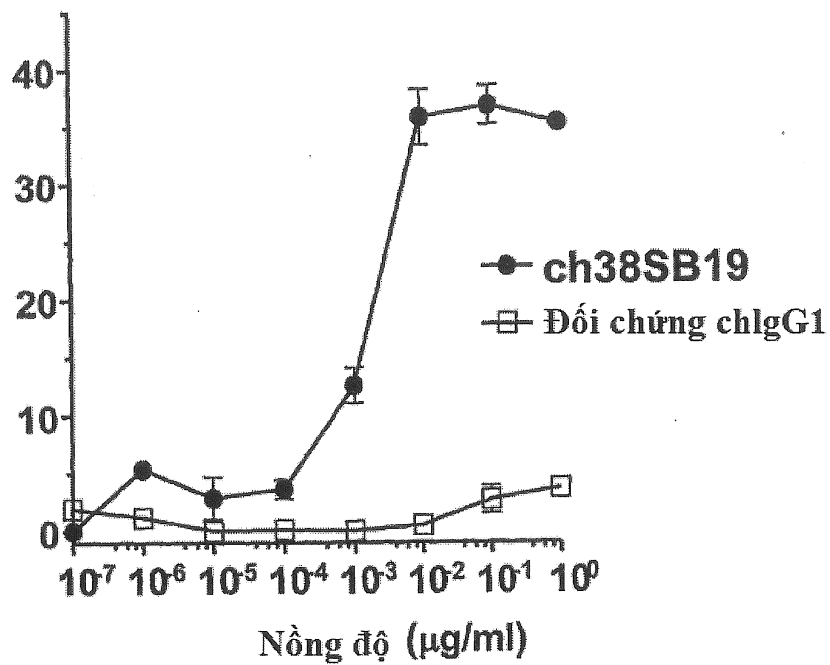


Fig. 8A

% ly giải đặc hiệu

**Fig. 8B**

% ly giải đặc hiệu

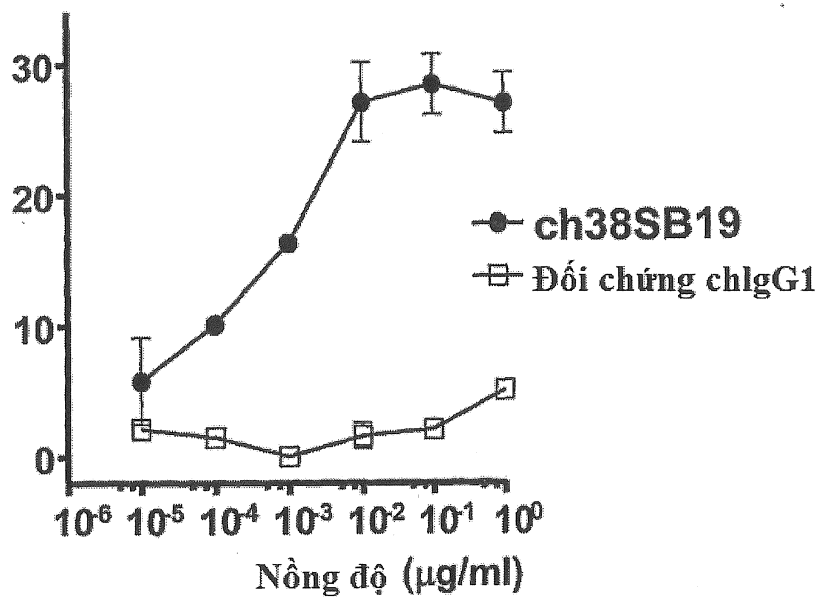
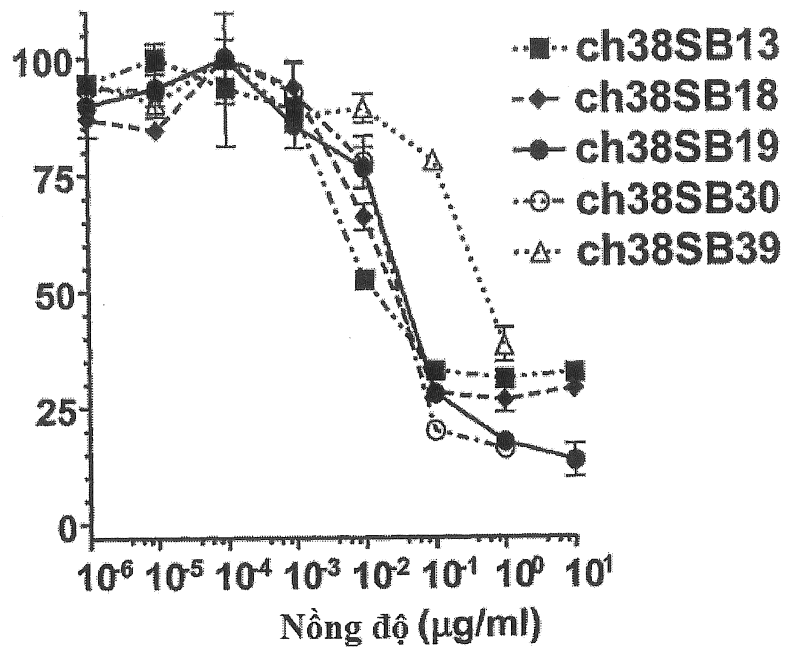


Fig. 9 A

% khả năng sống được cụ thể

**Fig. 9 B**

% khả năng sống được cụ thể

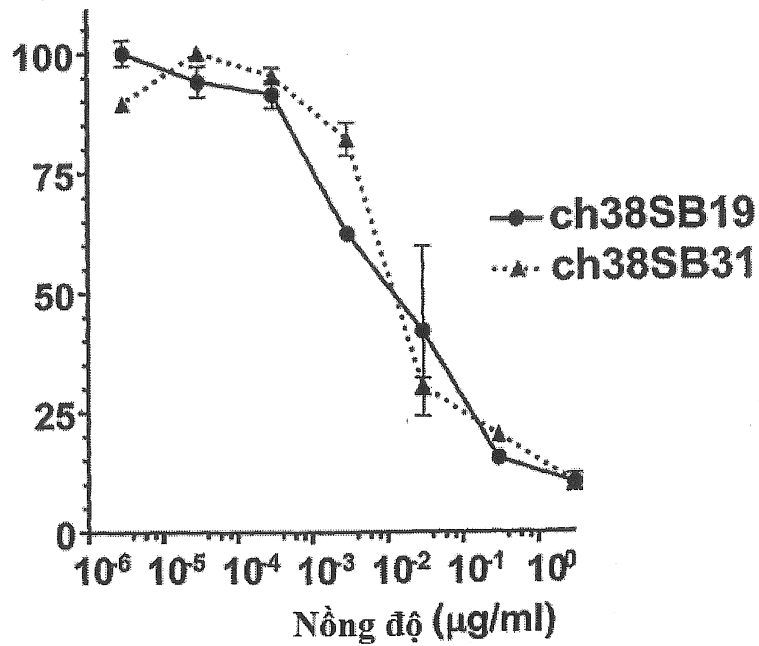


Fig. 10

% khả năng sống được cụ thể

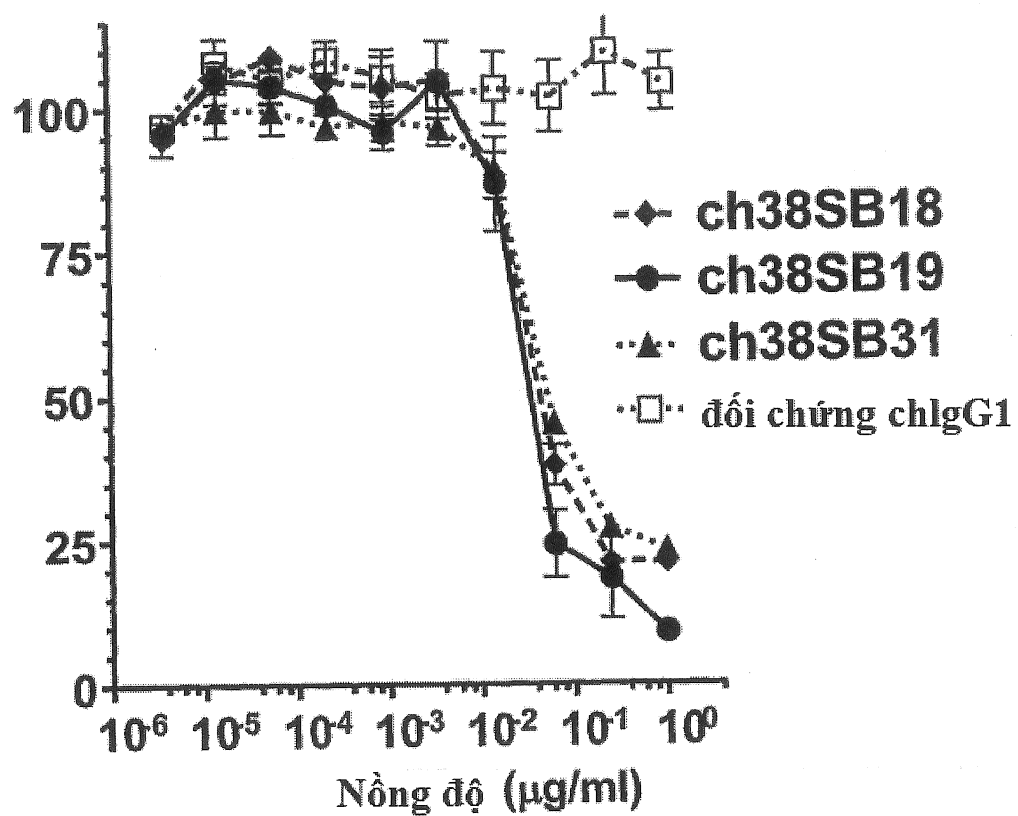
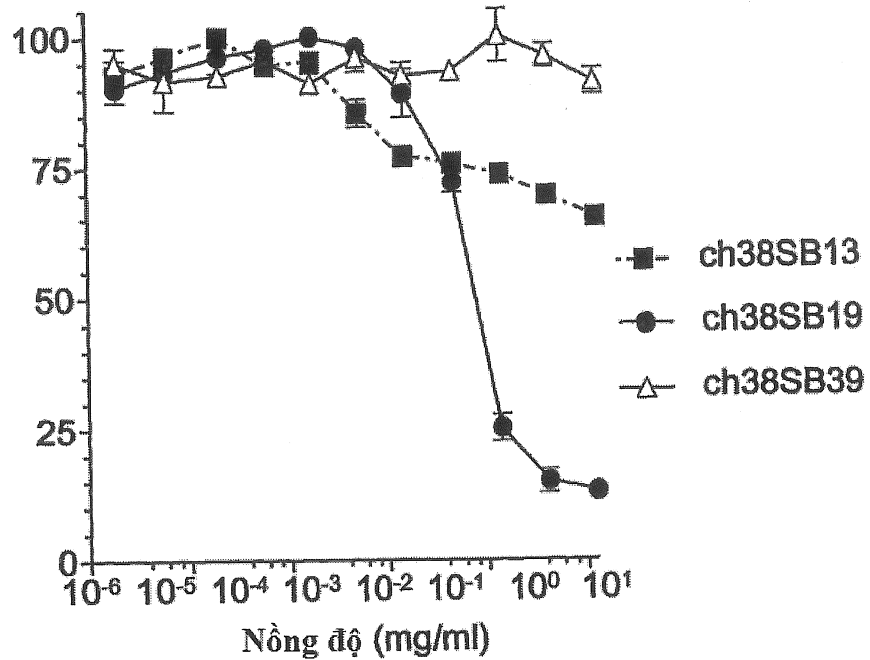


Fig. 11A

% khả năng sống được cụ thể

**Fig. 11B**

% khả năng sống được cụ thể

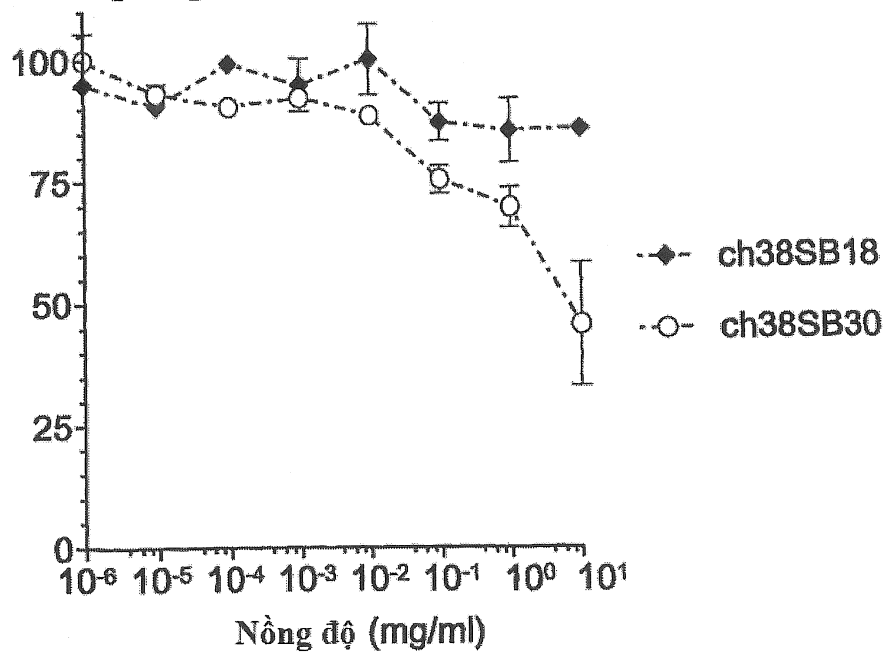


Fig. 11C

% khả năng sống được cụ thể

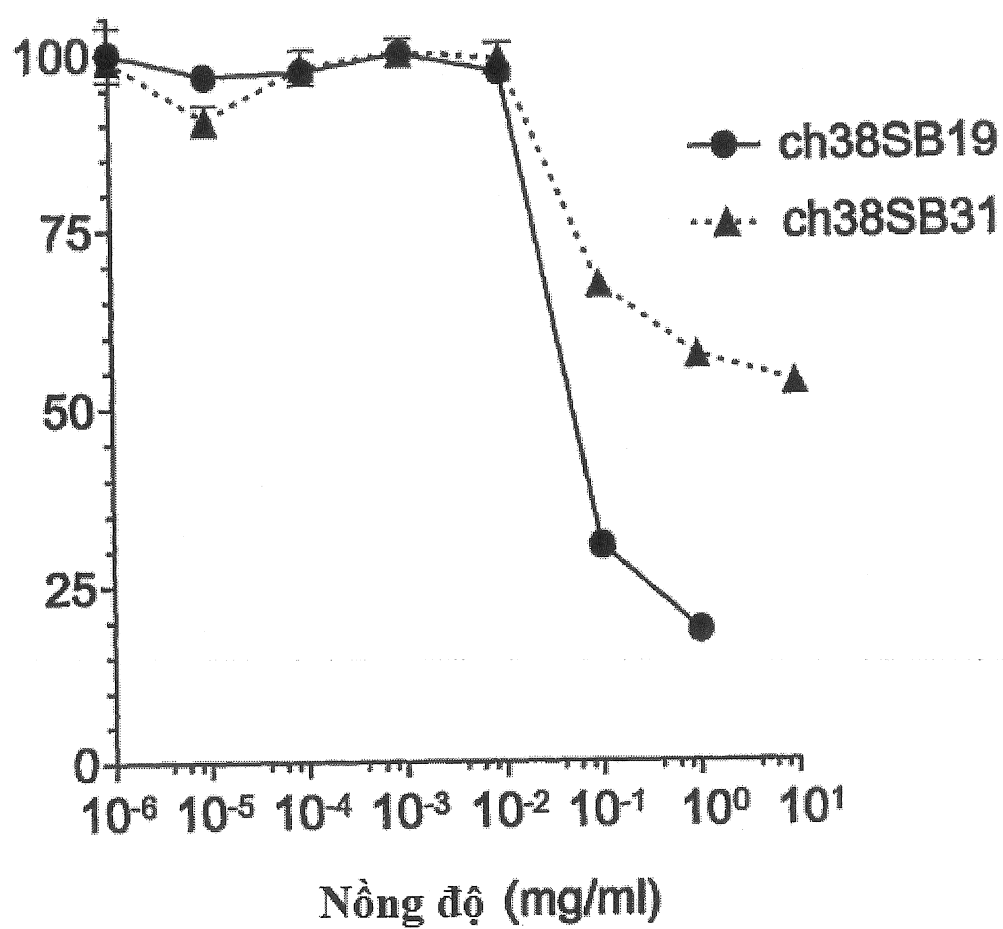
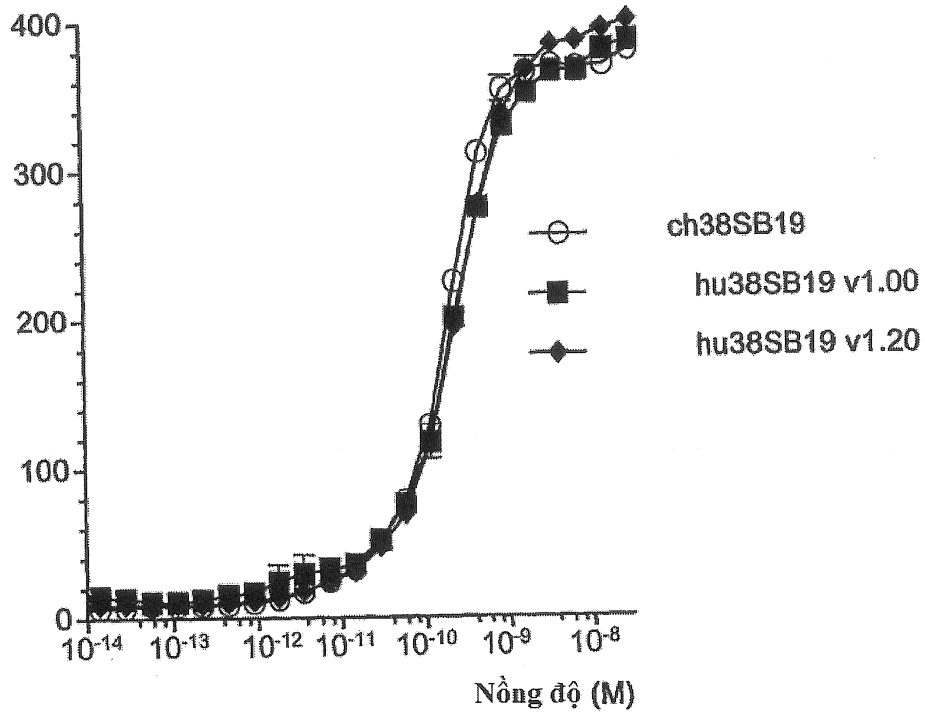


Fig. 12A

Phương tiện huỳnh quang liên quan

**Fig. 12B**

Phương tiện huỳnh quang liên quan

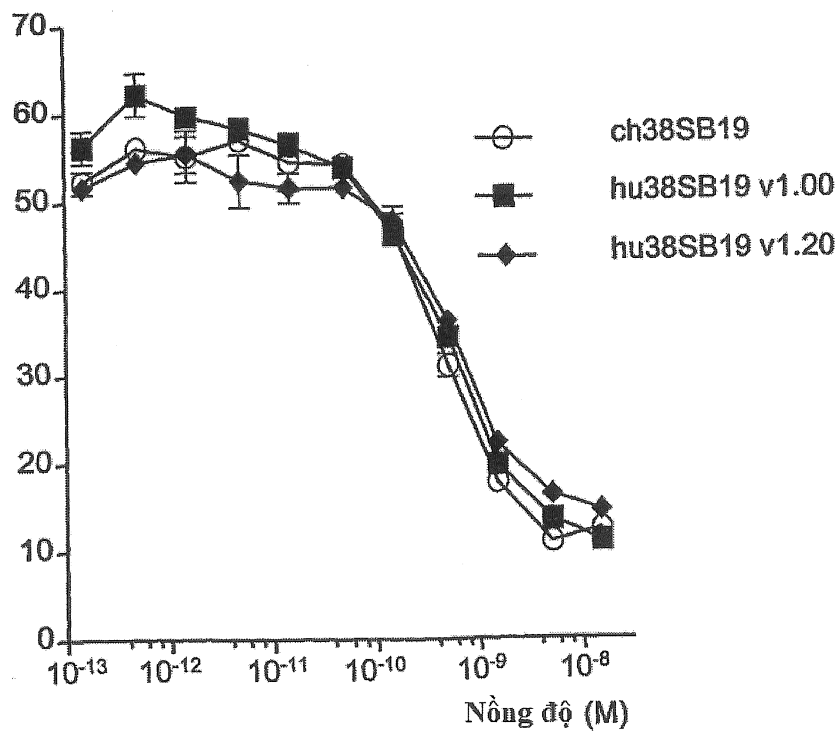
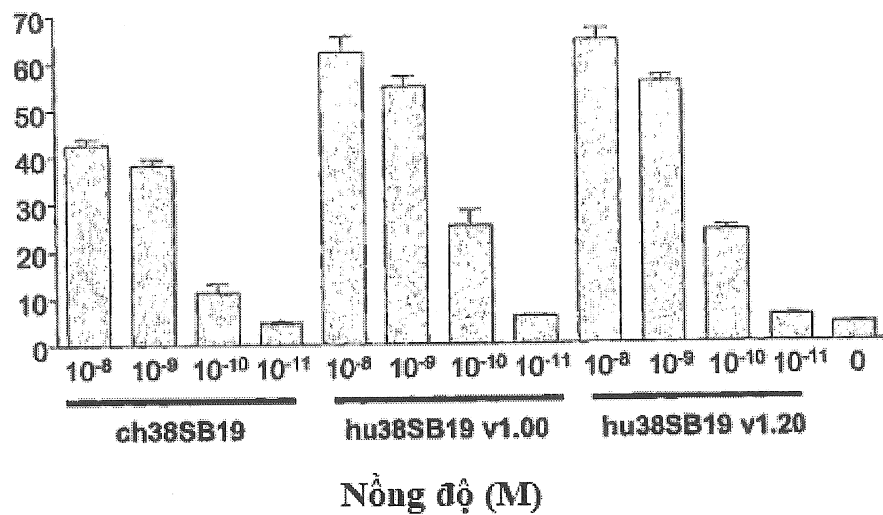


Fig. 13

% tế bào Annexin V dương tính

**Fig. 14**

% ly giải đặc hiệu

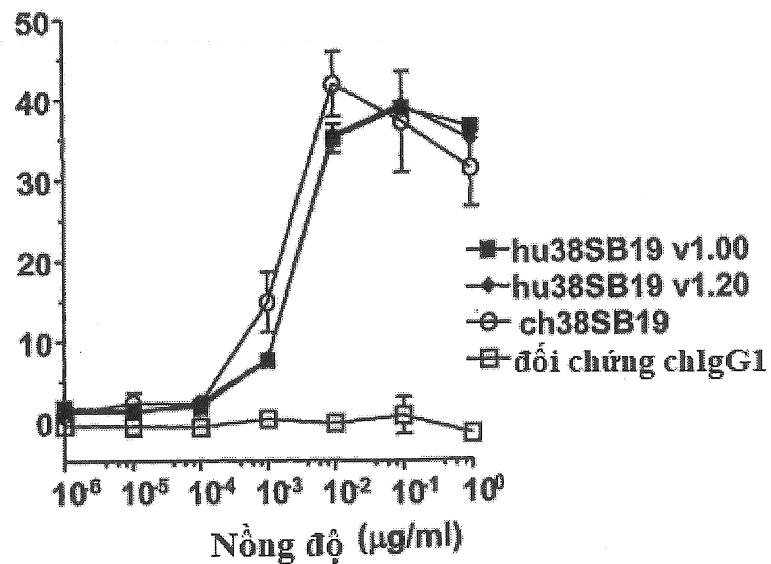


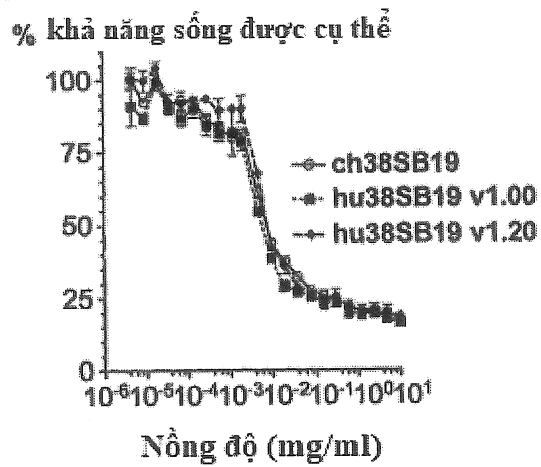
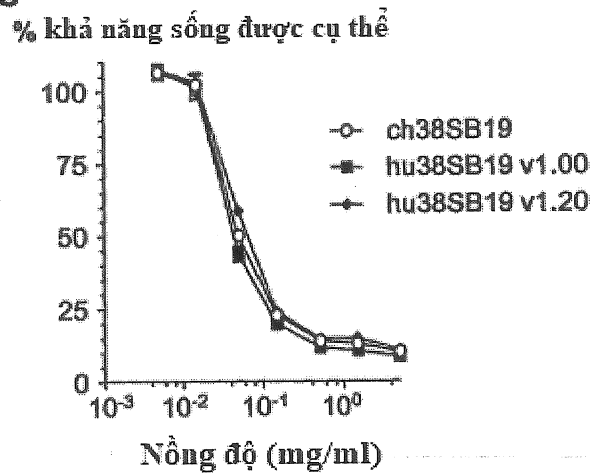
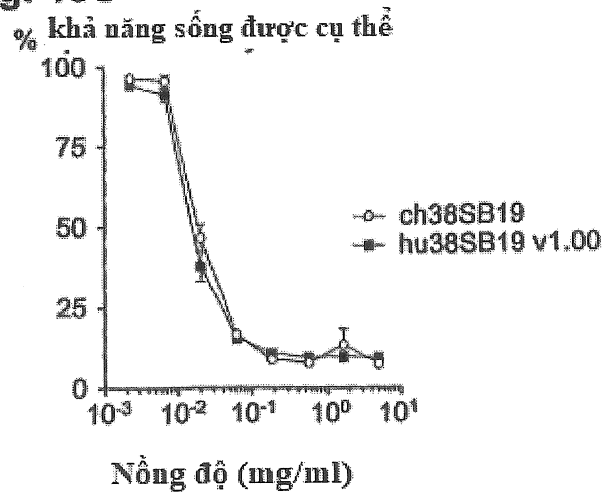
Fig. 15A**Fig. 15B****Fig. 15C**

Fig. 16

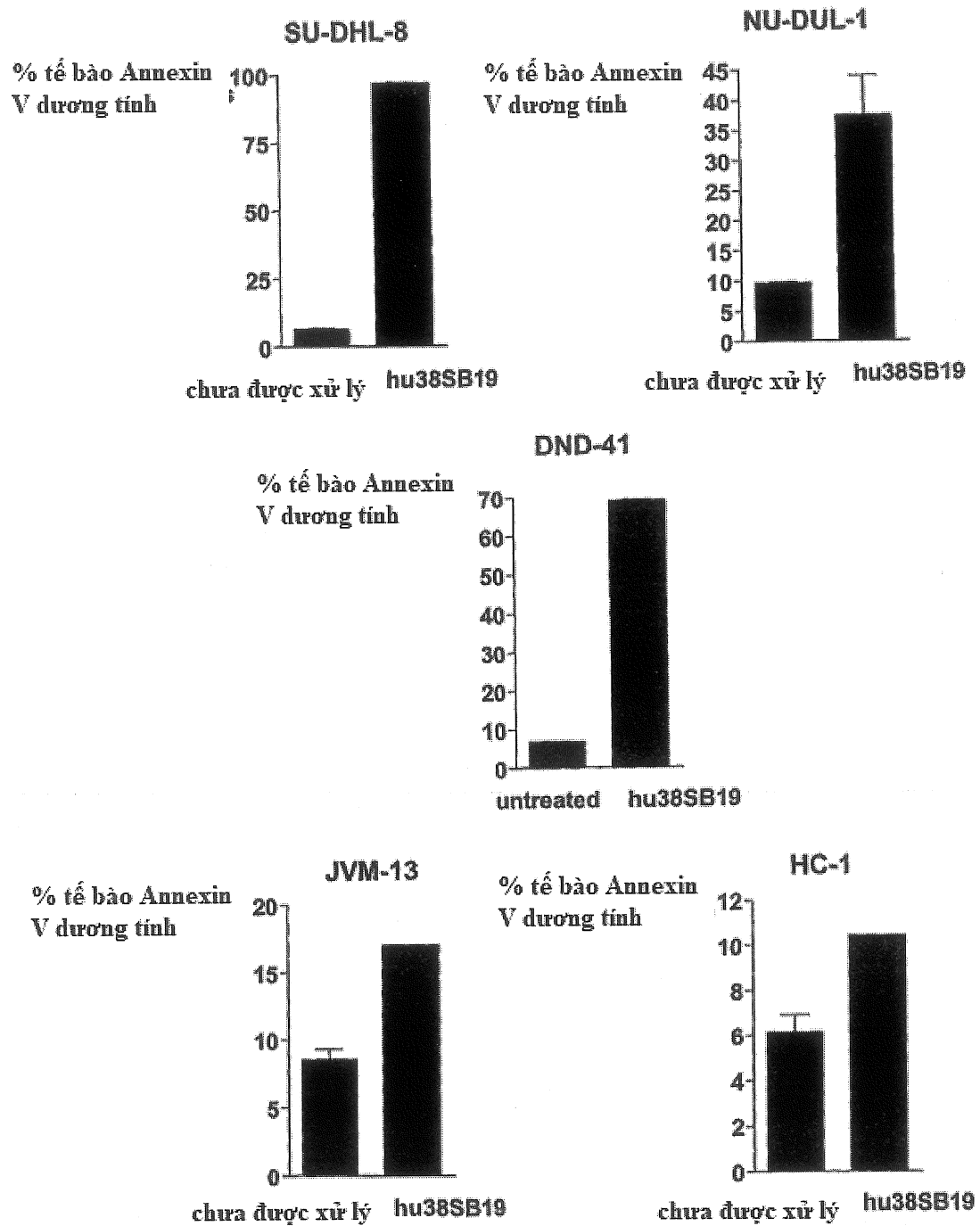
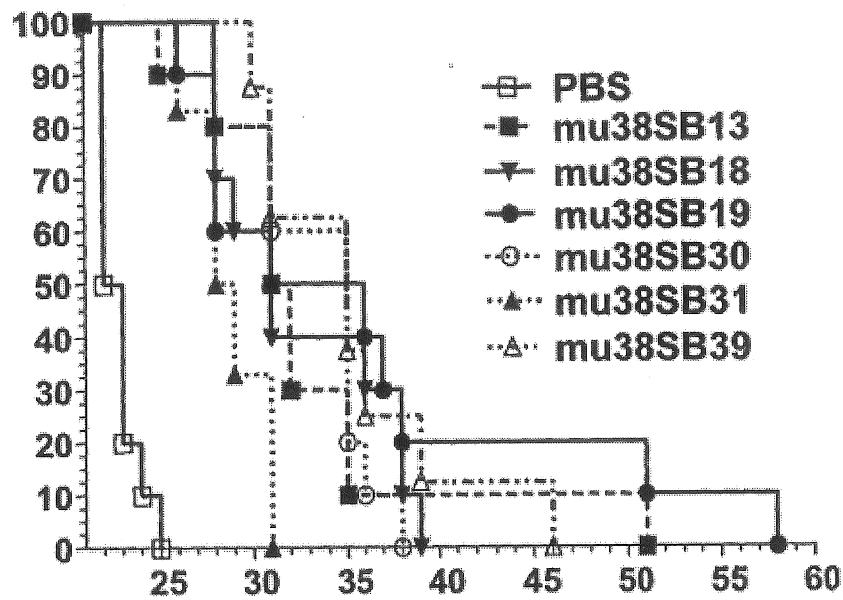


Fig. 17

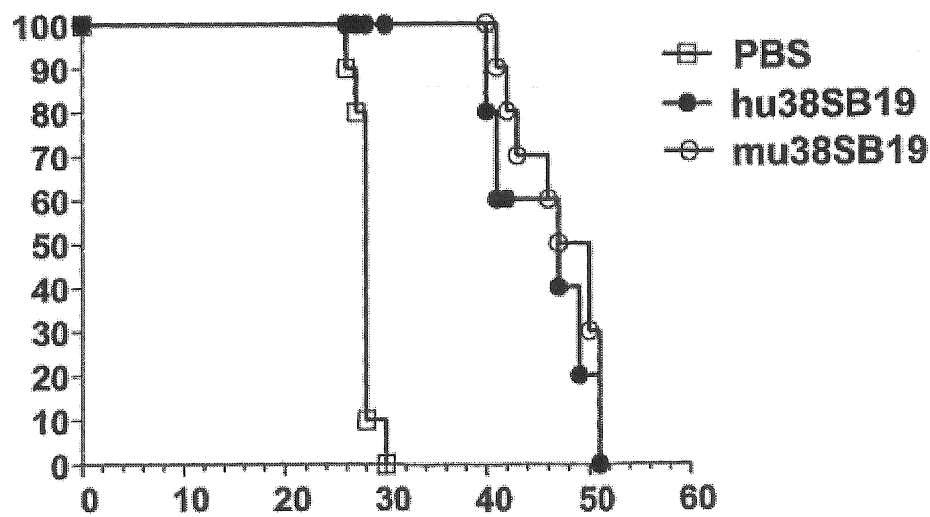
% Sống sót



Ngày sau iv sự cấy ghép tế bào khối u

Fig. 18

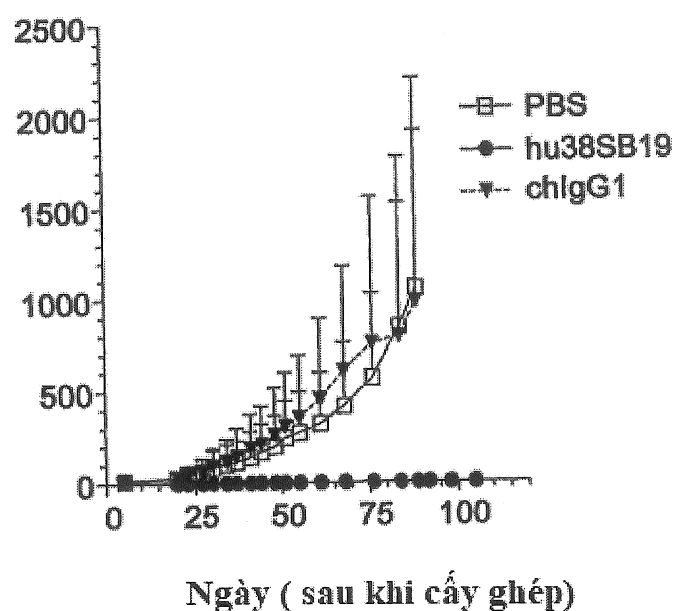
% Sống sót



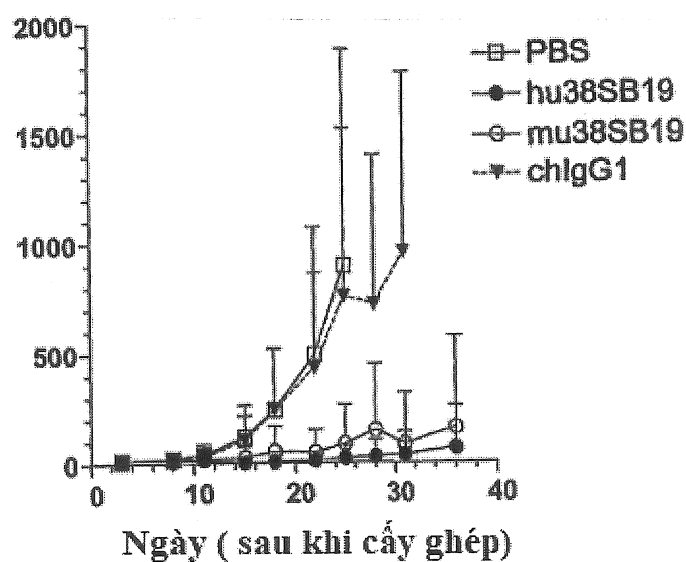
Ngày sau iv sự cấy ghép tế bào khối u

Fig. 19

Số lượng khối u
ác tính (mm^3)

**Fig. 20**

Số lượng khối u
ác tính (mm^3)



DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> SANOFI-AVENTIS
 <120> KHÁNG THỂ NHÂN HÓA HOẶC TÁI TẠO BỀ MẶT MÀ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU CD35

<130> FR2006-043

<160> 80

<170> PatentIn phiên bản 3.3

<210> 1
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 1

Ser Tyr Gly Met Asn
 1 5

<210> 2
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 2

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 3

Arg Gly Phe Ala Tyr
 1 5

<210> 4
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 4

Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr Gly Asn Gly Phe Met Asn
 1 5 10 15

<210> 5
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 5

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser

1 5

<210> 6
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 6

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Phe Thr
 1 5

<210> 7
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 7

Asn Ser Gly Met Asn
 1 5

<210> 8
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 8

Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe Lys
 1 5 10 15

Gly

<210> 9
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 9

Arg Gly Phe Val Tyr
 1 5

<210> 10
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 10

Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr Gly Asn Ser Phe Leu Lys
 1 5 10 15

<210> 11
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 11

Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser
1 5

<210> 12
<211> 9
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 12

Gln Gln Ile Asn Glu Asp Pro Tyr Thr
1 5

<210> 13
<211> 5
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 13

Asp Tyr Trp Met Gln
1 5

<210> 14
<211> 17
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 14

Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 15
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 15

Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr
1 5 10

<210> 16
<211> 11
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 16

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val Val Ala
1 5 10

<210> 17
<211> 7
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 17

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile
1 5

<210> 18

<211> 9

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 18

Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 19

<211> 5

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 19

Gly Ser Trp Met Asn
1 5

<210> 20

<211> 17

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 20

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

Asp

<210> 21

<211> 10

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 21

Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 22

<211> 11

<212> PRT

<213> Mus sp.

<400> 22

Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala Val Ala
1 5 10

<210> 23

<211> 7

<212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 23

Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr
 1 5

<210> 24
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 24

Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr Thr
 1 5

<210> 25
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 25

Ser Tyr Thr Leu Ser
 1 5

<210> 26
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 26

Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val Glu
 1 5 10 15

Gly

<210> 27
 <211> 8
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 27

Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe
 1 5

<210> 28
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 28

Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala Val Ala
 1 5 10

<210> 29
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 29

Trp Ala Ser Thr Arg His Thr
 1 5

<210> 30
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 30

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 31
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 31

Asn Phe Gly Met His
 1 5

<210> 32
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 32

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

Gly

<210> 33
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 33

Ser Tyr Tyr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr
 1 5 10

<210> 34
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 34

Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn Val Ala
 1 5 10

<210> 35
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 35

Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser
 1 5

<210> 36
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 36

Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu Thr
 1 5

<210> 37
 <211> 336
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(336)

<400> 37	
aac att gtg ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct ctt ggg	48
Asn Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly	
1 5 10 15	
cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gaa agt gtt gag att tat	96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Glu Ile Tyr	
20 25 30	
ggc aat ggt ttt atg aac tgg ttc cag cag aaa cca gga cag cca ccc	144
Gly Asn Gly Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro	
35 40 45	
aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc	192
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala	
50 55 60	
agg ttc agt gcc agt ggg tct agg aca gag ttc acc ctc acc att gat	240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Glu Phe Thr Leu Thr Ile Asp	
65 70 75 80	
cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt caa caa att aat	288
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn	
85 90 95	
gag gat cca ttc acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgg	336
Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg	
100 105 110	

<210> 38
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 38

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

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

Gly Asn Gly Phe Met Asn Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

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

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

Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105 110

<210> 39

<211> 336

<212> ADN

<213> Mus sp.

<220>

<221> cds

<222> (1)..(336)

<400> 39

gac att gta ctg acc caa tct cca gct tct ttg gct gtg tct cta ggg 48
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
1 5 10 15

cag agg gcc acc ata tcc tgc aga gcc agt gag agt gtt gct att tat 96
Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr
20 25 30

ggc aat agt ttt ctg aaa tgg ttc cag cag aaa ccg gga cag cca ccc 144
Gly Asn Ser Phe Leu Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
35 40 45

aaa ctc ctc atc tat cgt gca tcc aac cta gaa tct ggg atc cct gcc 192
Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
50 55 60

agg ttc agt ggc agt ggg tct ggg aca gac ttc acc ctc acc att aat 240
Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
65 70 75 80

cct gtg gag gct gat gat gtt gca acc tat tac tgt cag caa att aat 288
Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
85 90 95

gag gat ccg tac acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg 336
Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg

100 105 110
 <210> 40
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus sp.
 <400> 40
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu Gly
 1 5 10 15
 Gln Arg Ala Thr Ile Ser Cys Arg Ala Ser Glu Ser Val Ala Ile Tyr
 20 25 30
 Gly Asn Ser Phe Leu Lys Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro
 35 40 45
 Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Ala Ser Asn Leu Glu Ser Gly Ile Pro Ala
 50 55 60
 Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Asn
 65 70 75 80
 Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Ile Asn
 85 90 95
 Glu Asp Pro Tyr Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105 110

<210> 41
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 41
 gac att gtg atg gcc cag tct cac aaa ttc atg tcc aca tca gtt gga 48
 Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg agt act gtt 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
 20 25 30
 gtg gcc tgg tat caa cag aaa cca gga caa tct cct aaa cga ctg att 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Arg Leu Ile
 35 40 45
 tac tcg gca tcc tat cgg tat att gga gtc cct gat cgc ttc act ggc 192
 Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg acg gat ttc act ttc acc atc agc agt gtg cag gct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt cag caa cat tat agt cct ccg tac 288
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
 85 90 95

acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 42
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 42

Asp Ile Val Met Ala Gln Ser His Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

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

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80

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

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

<210> 43
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 43 48
 gac att gtg atg acc cag tct cac aaa ttc ttg tcc aca tca gtt gga
 Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Leu Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15

gac agg gtc agt atc acc tgc aag gcc agt cag gat gtg gtt act gct 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Val Thr Ala
 20 25 30

gtt gcc tgg ttt caa cag aaa cca gga caa tct cca aaa cta ctg att 144
 Val Ala Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45

tat tcg gca tcc cac cgg tac act gga gtc cct gat cgc ttc act ggc 192
 Tyr Ser Ala Ser His Arg Tyr Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ttc acc atc atc agt gtg cag gct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ile Ser Val Gln Ala
 65 70 75 80
 gaa gac ctg gca gtt tat tac tgt caa caa cat tat act act ccc acg 288
 Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Thr Thr Pro Thr
 85 90 95
 acg ttc ggt gga ggc acc aag ctg gac ttc aga cgg 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Asp Phe Arg Arg
 100 105

<210> 44
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 44

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

<210> 45
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 45
 gac act gtg atg acc cag tct cac aaa ttc ata tcc aca tca gtt gga 48
 Asp Thr Val Met Thr Gln Ser His Lys Phe Ile Ser Thr Ser Val Gly
 1 5 10 15
 gac agg gtc agc atc acc tgc aag gcc agt cag gtt gtg ggt agt gct 96

Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
 20 25 30
 gta gcc tgg tat caa cag aaa cca ggg caa tct cct aaa cta ctg att 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tac tgg gca tcc acc cgg cac act gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 agt gga tct ggg aca gat ttc act ctc acc att agc aat gtg cag tct 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 gaa gac ttg gca gat tat ttc tgt cag caa tat aac agc tat ccg tac 288
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 acg ttc gga ggg ggg acc aag ctg gaa ata aaa cgg 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 46
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 46

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

<210> 47
 <211> 324
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(324)

<400> 47
gac att gtg atg acc cag tct caa aaa ttc atg tcc aca tca gta gga 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Gln Lys Phe Met Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15
gac agg gtc agc gtc acc tgc aag gcc agt cag aat gtg ggt act aat 96
Asp Arg Val Ser Val Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asn Val Gly Thr Asn
20 25 30
gtt gcc tgg tat caa cac aaa cca gga caa tcc cct aaa ata atg att 144
Val Ala Trp Tyr Gln His Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Ile Met Ile
35 40 45
tat tcg gcg tcc tcc cgg tac agt gga gtc cct gat cgc ttc aca ggc 192
Tyr Ser Ala Ser Ser Arg Tyr Ser Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
agt gga tct ggg aca ctt ttc act ctc acc atc aac aat gtg cag tct 240
Ser Gly Ser Gly Thr Leu Phe Thr Leu Thr Ile Asn Asn Val Gln Ser
65 70 75 80
gaa gac ttg gca gag tat ttc tgt cag caa tat aac agc tat cct ctc 288
Glu Asp Leu Ala Glu Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Leu
85 90 95
acg ttc ggc tcg ggg aca aag ttg gaa ata aaa cgg 324
Thr Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 48
<211> 108
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 48

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

<210> 49
<211> 342

<212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(342)

<400> 49
 cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag 48
 Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
 1 5 10 15
 aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ctc aca agc tac 96
 Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Leu Thr Ser Tyr
 20 25 30
 gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg 144
 Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
 35 40 45
 ggc tgg ata aac acc tac act gga gaa cca aca tat gct gat gac ttt 192
 Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
 50 55 60
 aag gga cgt ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc act gcc ttt 240
 Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Thr Ala Phe
 65 70 75 80
 ttg cag atc aac aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt 288
 Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
 85 90 95
 gta aga cgc ggg ttt gct tac tgg ggc caa ggg act ctg gtc act gtc 336
 Val Arg Arg Gly Phe Ala Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
 100 105 110
 tct gca 342
 Ser Ala

<210> 50
 <211> 114
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

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

Leu Gln Ile Asn Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95

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

Ser Ala

<210> 51
<211> 342
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(342)

<400> 51
cag atc cag ttg gtg cag tct gga cct gag ctg aag aag cct gga gag 48
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15
aca gtc aag atc tcc tgc aag gct tct ggg tat acc ttc aca aac tct 96
Thr Val Lys Ile Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Ser
20 25 30
gga atg aac tgg gtg aag cag gct cca gga aag ggt tta aag tgg atg 144
Gly Met Asn Trp Val Lys Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Lys Trp Met
35 40 45
ggc tgg ata aac acc tac act gga gag ccg aca tat gct gat gac ttc 192
Gly Trp Ile Asn Thr Tyr Thr Gly Glu Pro Thr Tyr Ala Asp Asp Phe
50 55 60
aag gga cgg ttt gcc ttc tct ttg gaa acc tct gcc agc tct gcc tat 240
Lys Gly Arg Phe Ala Phe Ser Leu Glu Thr Ser Ala Ser Ser Ala Tyr
65 70 75 80
ttg cag atc agt aac ctc aaa aat gag gac acg gct aca tat ttc tgt 288
Leu Gln Ile Ser Asn Leu Lys Asn Glu Asp Thr Ala Thr Tyr Phe Cys
85 90 95
gca aga agg ggt ttt gtt tac tgg ggc caa ggg act ctg gta act gtc 336
Ala Arg Arg Gly Phe Val Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val
100 105 110
tct gca 342
Ser Ala

<210> 52
<211> 114
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 52
Gln Ile Gln Leu Val Gln Ser Gly Pro Glu Leu Lys Lys Pro Gly Glu
1 5 10 15

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

<210> 53
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> cds
 <222> (1)..(360)

<400> 53
 cag gtt cag ctc cag cag tct ggg gct gag ctg gca aga cct ggg act 48
 Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Ala Arg Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 tca gtg aag ttg tcc tgt aag gct tct ggc tac acc ttt act gac tac 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 tgg atg cag tgg gta aaa cag agg cct gga cag ggt ctg gag tgg att 144
 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 ggg act att tat cct gga gat ggt gat act ggg tac gct cag aag ttc 192
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 aag ggc aag gcc aca ttg act gcg gat aaa tcc tcc aaa aca gtc tac 240
 Lys Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 atg cac ctc agc agt ttg gct tct gag gac tct gcg gtc tat tac tgt 288
 Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 gca aga ggg gat tac tac ggt agt aat tct ttg gac tat tgg ggt caa 336
 Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
 100 105 110
 gga acc tca gtc acc gtc tcc tca 360

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 54
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 54

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 55
<211> 357
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(357)

<400> 55
cag gtc cag tta cag caa tct gga cct gaa ctg gtg agg cct ggg gcc 48
Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala
1 5 10 15

tca gtg aag att tcc tgc aaa act tct ggc tac gca ttc agt ggc tcc 96
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Gly Ser
20 25 30

tgg atg aac tgg gtg aag cag agg cct gga cag ggt cta gag tgg att 144
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
35 40 45

gga cgg att tat ccg gga gat gga gat atc att tac aat ggg aat ttc 192
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe

50	55	60	
agg gac aag gtc aca ctg tct gca gac aaa tcc tcc aac aca gcc tac			240
Arg Asp Lys Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr			
65	70	75	80
atg cag ctc agc agc ctg acc tct gtg gac tct gcg gtc tat ttt tgt			288
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys			
	85	90	95
tcg aga tgg ggg aca ttt acg ccg agt ttt gac tat tgg ggc caa ggc			336
Ser Arg Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly			
	100	105	110
acc act ctc aca gtc tcc tca			357
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser			
	115		

<210> 56
 <211> 119
 <212> PRT
 <213> Mus sp.

<400> 56

Gln Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Pro Glu Leu Val Arg Pro Gly Ala	
1	15
Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Thr Ser Gly Tyr Ala Phe Ser Gly Ser	
	30
Trp Met Asn Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile	
	45
Gly Arg Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Ile Ile Tyr Asn Gly Asn Phe	
50	60
Arg Asp Lys Val Thr Leu Ser Ala Asp Lys Ser Ser Asn Thr Ala Tyr	
65	80
Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Val Asp Ser Ala Val Tyr Phe Cys	
	95
Ser Arg Trp Gly Thr Phe Thr Pro Ser Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly	
	110
Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser	
	115

<210> 57
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 57
gac gtg aag ctg gtg gag tct ggg gga ggc tta gtg aag cct gga ggg 48
Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

tcc ctg aaa ctc tcc tgt gaa gcc tct gga ttc act ttc agt agc tat 96
Ser Leu Lys Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
20 25 30

acc ctg tct tgg gtt cgc cag act ccg gag acg agg ctg gag tgg gtc 144
Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

gca acc att agt att ggt ggt cgc tac acc tat tat cca gac agt gtg 192
Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
50 55 60

gag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat gcc aag aac acc ctg tac 240
Glu Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
65 70 75 80

ctg caa atg aac agt ctg aag tct gag gac aca gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95

aca aga gat ttt aat ggt tac tct gac ttc tgg ggc caa ggc acc act 336
Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
100 105 110

ctc aca gtc tcc tca 351
Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 58
<211> 117
<212> PRT
<213> MUS sp.

<400> 58
Asp Val Lys Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
1 5 10 15

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

Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Glu Thr Arg Leu Glu Trp Val
35 40 45

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

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

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

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

Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 59
<211> 360
<212> ADN
<213> Mus sp.

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(360)

<400> 59
aat gta cag ctg gta gag tct ggg gga ggc tta gtg cag cct gga ggg 48
Asn Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
tcc cgg aaa ctg tcc tgt gca gcc tct gga ttc act ttc agt aac ttt 96
Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30
gga atg cac tgg gtt cgt cag gct cca gag aag ggt ctg gag tgg gtc 144
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45
gca tac att cgt agt ggc agt ggt acc atc tac tat tca gac aca gtg 192
Ala Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60
aag ggc cga ttc acc atc tcc aga gac aat ccc aag aac acc ctg ttc 240
Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Pro Lys Asn Thr Leu Phe
65 70 75 80
ctg caa atg acc agt cta agg tct gag gac acg gcc atg tat tac tgt 288
Leu Gln Met Thr Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
85 90 95
gca aga tcc tac tat gat ttc ggg gcc tgg ttt gct tac tgg ggc caa 336
Ala Arg Ser Tyr Thr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110
ggg act ctg gtc act gtc tct gca 360
Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 60
<211> 120
<212> PRT
<213> Mus sp.

<400> 60
Asn Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly Gly
1 5 10 15
Ser Arg Lys Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Asn Phe
20 25 30
Gly Met His Trp Val Arg Gln Ala Pro Glu Lys Gly Leu Glu Trp Val
35 40 45

Ala Tyr Ile Arg Ser Gly Ser Gly Thr Ile Tyr Tyr Ser Asp Thr Val
50 55 60

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

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

Ala Arg Ser Tyr Tyr Asp Phe Gly Ala Trp Phe Ala Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ala
115 120

<210> 61
<211> 324
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 61
gat atc gta atg acc cag tcc cac ctg agt atg agt acc tcc ctg gga 48
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser His Leu Ser Met Ser Thr Ser Leu Gly
1 5 10 15
gat cct gtg tca atc act tgc aag gcc tca cag gat gtg agc acc gtc 96
Asp Pro Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Thr Val
20 25 30
gtt gct tgg tat cag cag aag ccc ggg caa tca ccc aga cgt ctc atc 144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Arg Arg Leu Ile
35 40 45
tac tca gca tca tac cgt tac atc ggg gtg cct gac cga ttt act ggc 192
Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Ile Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
50 55 60
tct ggc gct ggc aca gat ttc acc ttt aca att agt tcc gtc cag gcc 240
Ser Gly Ala Gly Thr Asp Phe Thr Phe Thr Ile Ser Ser Val Gln Ala
65 70 75 80
gaa gac ctg gcc gtg tac tac tgc cag cag cac tac agt ccc cca tac 288
Glu Asp Leu Ala Val Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95
act ttc ggg gga ggg act aag ctc gaa atc aaa cgt 324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
100 105

<210> 62
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 62

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

<210> 64

<211> 108
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại
 <400> 64

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

<210> 65
 <211> 360
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(360)

<400> 65
 cag gta cag ctc gtt cag tcc ggc gcc gag gta gct aag cct ggt act 48
 Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Ala Lys Pro Gly Thr
 1 5 10 15
 tcc gta aaa ttg tcc tgt aag gct tcc ggg tac aca ttt aca gac tac 96
 Ser Val Lys Leu Ser Cys Lys Ala Ser Gly Tyr Thr Phe Thr Asp Tyr
 20 25 30
 tgg atg cag tgg gta aaa cag cgg cca ggt cag gcc ctg gag tgg att 144
 Trp Met Gln Trp Val Lys Gln Arg Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile
 35 40 45
 gga aca ata tat ccc ggc gac gcc gac aca gcc tat gcc cag aag ttt 192
 Gly Thr Ile Tyr Pro Gly Asp Gly Asp Thr Gly Tyr Ala Gln Lys Phe
 50 55 60
 caa gcc aag gca acc ctt act gct gat aaa tct tcc aag act gtc tac 240
 Gln Gly Lys Ala Thr Leu Thr Ala Asp Lys Ser Ser Lys Thr Val Tyr
 65 70 75 80
 atg cat ctg tct tcc ttg gca tct gag gat agc gct gtc tat tac tgt 288
 Met His Leu Ser Ser Leu Ala Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
 85 90 95

gct agg ggg gac tac tat ggg tca aat tcc ctg gat tac tgg ggc cag 336
Ala Arg Gly Asp Tyr Tyr Gly Ser Asn Ser Leu Asp Tyr Trp Gly Gln
100 105 110

ggc acc agt gtc acc gtg agc agc 360
Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 66
<211> 120
<212> PRT
<213> Người hiện đại
<400> 66

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

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 67
<211> 324
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 67 48
gac acc gtg atg acc cag tcc ccc tcc acc atc tcc acc tct gtg ggc
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Ile Ser Thr Ser Val Gly
1 5 10 15

gac cgg gtg tcc atc acc tgt aag gcc tcc cag gtg gtg ggc tcc gcc 96
Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
20 25 30

```

gtg gcc tgg tat cag cag aag cct ggc cag tcc cct aag ctg ctg atc      144
Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
      35      40      45

tac tgg gcc tcc acc cgg cat acc ggc gtg cct gac cgg ttc acc ggc      192
Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Asp Arg Phe Thr Gly
      50      55      60

tcc gcc agc gcc acc gac ttc acc ctg acc atc tcc aac gtg cag tcc      240
Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
      65      70      75

gac gac ctg gcc gac tac ttc tgc cag cag tac aac tcc tac cct tac      288
Asp Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
      85      90      95

acc ttt gcc gcc gga aca aag ctg gag atc aag cgt      324
Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
      100      105

<210> 68
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 68
Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Thr Ile Ser Thr Ser Val Gly
1      5      10      15

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

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

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

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

Asp Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
85      90      95

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

<210> 69
<211> 324
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<220>
<221> CDS
<222> (1)..(324)

<400> 69
gac acc gtg atg acc cag tcc ccc tcc tcc atc tcc acc tcc atc ggc      48

```

Asp Thr Val Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Ile Ser Thr Ser Ile Gly
 1 5 10 15
 gac cgg gtg tcc atc acc tgt aag gcc tcc cag gtg gtg ggc tcc gcc 96
 Asp Arg Val Ser Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Val Val Gly Ser Ala
 20 25 30
 gtg gcc tgg tat cag cag aag cct gcc cag tcc cct aag ctg ctg atc 144
 Val Ala Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile
 35 40 45
 tac tgg gcc tcc acc cgg cat acc gcc gtg cct gcc cgg ttc acc gcc 192
 Tyr Trp Ala Ser Thr Arg His Thr Gly Val Pro Ala Arg Phe Thr Gly
 50 55 60
 tcc gcc agc gcc acc gac ttc acc ctg acc atc tcc aac gtg cag tcc 240
 Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Asn Val Gln Ser
 65 70 75 80
 gag gac ctg gcc gac tac ttc tgc cag cag tac aac tcc tac cct tac 288
 Glu Asp Leu Ala Asp Tyr Phe Cys Gln Gln Tyr Asn Ser Tyr Pro Tyr
 85 90 95
 acc ttt gcc gcc gga aca aag ctg gag atc aag cgt 324
 Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
 100 105

<210> 70
 <211> 108
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 70

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

<210> 71
 <211> 351
 <212> ADN
 <213> Người hiện đại

<220>
 <221> CDS
 <222> (1)..(351)

<400> 71
 gag gtg cag ctg gtg gag tct ggc ggc gga ctg gtg aag cct ggc ggc 48
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly 10 Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5
 tcc ctg agg ctg tcc tgt gag gcc tcc ggc ttc acc ttc tcc tcc tac 96
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 acc ctg tcc tgg gtg agg cag acc cct ggc aag ggc ctg gag tgg gtg 144
 Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 gcc acc atc tcc atc ggc ggc agg tac acc tac tac cct gac tcc gtg 192
 Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 aag ggc cgg ttc acc atc tcc cgg gac aac gcc aag aac acc ctg tac 240
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 ctg cag atg aac tcc ctg aag tcc gag gac acc gcc atg tac tac tgt 288
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95
 acc cgg gac ttc aac ggc tac tcc gac ttc tgg ggc cag ggc acc aca 336
 Thr Arg Asp Phe Asn Gly Tyr Ser Asp Phe Trp Gly Gln Gly Thr Thr
 100 105 110
 ctg acc gtg tcc tcc 351
 Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 72
 <211> 117
 <212> PRT
 <213> Người hiện đại

<400> 72
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Lys Pro Gly Gly
 1 5 10 15
 Ser Leu Arg Leu Ser Cys Glu Ala Ser Gly Phe Thr Phe Ser Ser Tyr
 20 25 30
 Thr Leu Ser Trp Val Arg Gln Thr Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
 35 40 45
 Ala Thr Ile Ser Ile Gly Gly Arg Tyr Thr Tyr Tyr Pro Asp Ser Val
 50 55 60
 Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ala Lys Asn Thr Leu Tyr
 65 70 75 80
 Leu Gln Met Asn Ser Leu Lys Ser Glu Asp Thr Ala Met Tyr Tyr Cys
 85 90 95

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

Leu Thr Val Ser Ser
 115

<210> 73
 <211> 36
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 73
 ggaggatcca tagacagatg ggggtgtcgt ttggc 36

<210> 74
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<400> 74
 ggaggatccc ttgaccaggc atcctagagt ca 32

<210> 75
 <211> 32
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(32)
 <223> bazo hỗn hợp được định nghĩa như sau: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T,
 K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V=A+C+G, N=A+C+G+T
 <400> 75
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tc 32

<210> 76
 <211> 35
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> misc_feature
 <222> (1)..(35)
 <223> bazo hỗn hợp được định nghĩa như sau: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T,
 K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V=A+C+G, N=A+C+G+T
 <400> 76
 cttccggaat tcsargtnma gctgsagsag tcwgg 35

<210> 77
 <211> 31
 <212> ADN
 <213> Mus sp.

<220>
 <221> misc_feature

<222> (1)..(31)

<223> bazo hỗn hợp được định nghĩa như sau: H=A+T+C, S=G+C, Y=C+T,
K=G+T, M=A+C, R=A+G, W=A+T, V=A+C+G, N=A+C+G+T

<400> 77
ggagctcgay attgtgmts a cmcarwctmc a 31

<210> 78

<211> 46

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 78
tatagagctc aagcttggat ggtgggaaga tggatacagt tgggtgc 46

<210> 79

<211> 21

<212> DNA

<213> Mus sp.

<400> 79
atggagtcac agattcaggt c 21

<210> 80

<211> 32

<212> ADN

<213> Mus sp.

<400> 80
ttttgaattc cagtaacttc aggtgtccac tc 32