(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) **1-0032067**

(51)[7] **C07K 16/28**; A61K 47/48; C12N 15/13; A61P 35/00; A61K 39/395; A61K 51/10

(13) **B**

(21) 1-2013-02905 (22) 15/07/2008
(62) 1-2010-00398
(86) PCT/US2008/070088 15/07/2008 (87) WO2009/012268 22/01/2009
(30) 60/950,052 16/07/2007 US; 61/025,137 31/01/2008 US; 61/032,790 29/02/2008 US; 61/054,709 20/05/2008 US
(45) 25/05/2022 410 (43) 25/11/2013 308A
(73) Genentech, Inc. (US)
1 DNA Way, South San Francisco, California 94080, United States of America.
(72) CHEN, Yvonne (US); DENNIS, Mark (US); DORNAN, David (GB); ELKINS, Kristi (US); JUNUTULA, Jagath Reddy (IN); POLSON, Andrew (US); ZHENG, Bing (CN).
(74) Công ty Luật TNHH T&G (TGVN)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG CD79B, QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHÚNG, THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

(57) Sáng chế đề cập đến chế phẩm hữu ích để điều trị khối u tế bào tạo huyết ở động vật có vú. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD79b, phương pháp sản xuất chúng, và các thể liên hợp miễn dịch và chế phẩm, dược phẩm chứa chúng.

ADN 225786

```
MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE
```

Trình tự tín hiệu.
các axit amin 1-28.
Miền chuyển màng.
các axit amin 5-25, 159-179.
Miền globulin miễn dịch.
các axit amin 58-124.
Motif hoạt hoá dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch.
các axit amin 193-213.
Vị trí N-glycosyl hoá.
các axit amin 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.
Vị trí phosphoryl hoá protein kinaza C.
các axit amin 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.
Vị trí phoshoryl hoá casein kinaza II
các axit amin 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.
Vị trí phosphoryl hoá tyrosin kinaza.
các axit amin 113-120.
Vị trí N-myristoyl hoá.
các axit amin 40-45, 118-123.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến các chế phẩm hữu ích để điều trị khối u tế bào tạo huyết ở động vật có vú. Cụ thể hơn, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng CD79b, phương pháp sản xuất chúng, và các thể liên hợp miễn dịch và chế phẩm, dược phẩm chứa chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các khối u ác tính (bệnh ung thư) là nguyên nhân gây chết đứng thứ hai ở Mỹ, sau bệnh tim (Boring et al., *CA Cancel J. Clin.* 43:7 (1993)). Bệnh ung thư được đặc trưng bởi sự gia tăng số lượng tế bào bất thường hoặc khối u có nguồn gốc từ mô bình thường mà tăng sinh để tạo thành khối u, sự xâm lấn của khối u liền kề bởi các tế bào khối u này và tạo ra tế bào di căn mà cuối cùng mở rộng qua máu hoặc hệ bạch huyết thành hạch bạch huyết vùng và đến các vị trí khác biệt qua quy trình được gọi là di căn. Ở tình trạng bệnh ung thư, tế bào tăng sinh dưới các điều kiện trong đó tế bào bình thường không thể phát triển. Bệnh ung thư tự bản thân nó thể hiện ở rất nhiều dạng, được đặc trưng bởi các mức xâm lấn và xâm lược khác nhau.

Bệnh ung thư bao gồm tế bào được tạo ra trong thời gian tạo huyết, quy trình mà các yếu tố tế bào của máu, như tế bào bạch huyết, bạch cầu, tiểu huyết cầu, tế bào hồng cầu và tế bào giết chết tự nhiên được sinh ra được gọi là bệnh ung thư tế bào huyết. Tế bào bạch huyết có thể được tìm thấy trong máu và mô bạch huyết và là quyết định đối với đáp ứng miễn dịch được phân loại thành hai lớp chính của tế bào bạch huyết: tế bào bạch huyết B (tế bào B) và tế bào bạch huyết T (tế bào T), mà qua trung gian miễn dịch thể dịch và miễn dịch qua trung gian tế bào, tương ứng.

Sự trưởng thành của các tế bào B trong tuỷ xương và trong phần còn lại, tuỷ biểu hiện kháng thể gắn kết kháng nguyên trên bề mặt tế bào của chúng. Khi tế bào B nguyên gốc lần đầu tiên gặp kháng nguyên mà kháng thể gắn kết màng của nó là đặc hiệu, tế bào trở nên phân chia nhanh chóng và kết quả của nó là phân hoá thành các tế bào B nhớ và các tế bào phản ứng kích thích được gọi là "tế bào huyết tương". Các tế bào B nhớ có biên độ sống lâu hơn và tiếp tục biểu hiện kháng thể gắn kết màng với tính đặc hiệu tương tự như tế bào bố mẹ ban đầu. Các tế bào huyết tương không tạo ra

kháng thể gắn kết màng nhưng thay vào đó là tạo ra kháng thể ở dạng mà có thể được tiết. Các kháng thể được tiết là chất điều biến phản ứng kích thích miễn dịch thể dịch.

Sự trưởng thành của tế bào trong T trong tuyến ức mà tạo ra môi trường để tăng sinh và phân hoá tế bào T trưởng thành. Trong thời gian trưởng thành của tế bào T, các tế bào T trải qua sự sắp xếp gen mà tạo ra thụ thể tế bào T và chọn lọc dương và âm mà trợ giúp xác định kiểu hình bề mặt tế bào của tế bào T trưởng thành. Các chất đánh dấu bề mặt tế bào đặc trưng của tế bào T trưởng thành là phức hợp thụ thể CD3:tế bào T và của các cùng thụ thể, CD4 hoặc CD8.

Trong các nỗ lực để phát hiện các đích tế bào có hiệu quả để điều trị bệnh ung thư, các nhà nghiên cứu đã tìm kiếm để nhận biết polypeptit chuyển màng hoặc kết hợp màng khác mà biểu hiện đặc hiệu trên bề mặt của một hoặc nhiều (kiểu) cụ thể của tế bào ung thư như được so với một hoặc nhiều tế bào không ung thư bình thường. Thông thường, các polypeptit kết hợp màng này được biểu hiện nhiều hơn trên bề mặt của tế bào ung thư như được so với trên bề mặt của tế bào không ung thư. Việc nhận biết các polypeptit kháng nguyên bề mặt tế bào liên quan đến khối u đã làm nảy sinh khả năng tạo đích đặc hiệu tế bào ung thư để phá huỷ qua các điều trị dựa trên kháng thể. Liên quan đến vấn đề này, đã được lưu ý rằng điều trị dựa trên kháng thể đã chứng minh rất có hiệu quả trong điều trị một số bệnh ung thư. Ví dụ, HERCEPTIN® và RITUXAN® (cả hai của Genentech Inc., South San Francisco, California) là các kháng thể mà đã được sử dụng thành công để điều trị bệnh ung thư vú và u lympho không Hodgkin, tương ứng. Đặc biệt hơn là, HERCEPTIN® là kháng thể đơn dòng được làm thích hợp với người có nguồn gốc từ ADN tái tổ hợp mà gắn kết chọn lọc với miền ngoại bào của gen đột biến gây bệnh ung thư yếu tố phát triển biểu bì thụ thể 2 (HER2). Sự biểu hiện quả mức HER2 protein được quan sát ở 25-30% bệnh ung thư vú sơ cấp. RITUXAN® thường tạo ra kháng thể đơn dòng khảm của chuột/người trực tiếp kháng kháng nguyên CD20 được phát hiện trên bề mặt của tế bào bạch huyết B bình thường hoặc ắc tính. Các kháng thể này được tạo ra về mặt tái tổ hợp ở tế bào CHO.

Các nỗ lực khác để phát hiện các đích tế bào hiệu quả để điều trị bệnh ung thư, các nhà nghiên cứu đã tìm thấy để nhận biết (1) các polypeptit không kết hợp màng mà tạo ra đặc hiệu bởi một hoặc nhiều (kiểu) cụ thể hơn của (các) tế bào ung thư như được so với một hoặc nhiều kiểu cụ thể hơn của (các) tế bào thông thường không ung thư,

(2) polypeptit mà được tạo ra bởi các tế bào ung thư ở mức biểu hiện mà cao hơn đáng kể so với một hoặc nhiều tế bào thông thường không ung thư hoặc (3) polypeptit mà sự biểu hiện của nó được giới hạn đặc biệt chỉ đến (các) kiểu mô đơn (số lượng khác nhau rất giới hạn) ở tình trạng bệnh ung thư và không ung thư (ví dụ, mô tuyến tiền liệt thông thường và mô khối u tuyến tiền liệt). Các polypeptit này có thể vẫn được định vị nội bào hoặc có thể được tiết bởi tế bào ung thư. Ngoài ra, các polypeptit có thể được biểu hiện không bởi tự bản thân tế bào ung thư, nhưng tốt hơn bởi tế bào mà tạo ra và/hoặc tiết các polypeptit có hiệu quả hiệu lực hoặc gia tăng sự phát triển tế bào ung thư. Các polypeptit được tiết này thường là các protein mà tạo ra tế bào ung thư với thuận lợi phát triển so với tế bào thông thường và bao gồm các chất này như, ví dụ, các yếu tố hình thành mạch, yếu tố bám dính tế bào, yếu tố phát triển và tương tự. Việc nhận biết các chất đối kháng các polypeptit không kết hợp màng sẽ được mong đợi có tác dụng như các chất điều trị hiệu quả để điều trị các bệnh ung thư này. Ngoài ra, việc nhận biết mẫu biểu hiện của các polypeptit này có thể là hữu ích để chẩn đoán các bệnh ung thư cụ thể ở động vật có vú.

Không kể các tiến bộ được xác định trên đây trong điều trị bệnh ung thư ở động vật có vú, có nhu cầu lớn đối với các chất điều điều trị bổ sung có khả năng phát hiện sự có mặt của khối u ở động vật có vú và ức chế hiệu quả sự phát triển tế bào khối u, tương ứng. Do đó, mục đích của của sáng chế là để nhận biết các polypeptit, kết hợp màng tế bào, tiết hoặc các polypeptit nội bào mà sự biểu hiện của nó được giới hạn đặc hiệu chỉ đến (các) kiểu mô (hoặc số lượng khác nhau rất giới hạn), các mô tạo huyết, ở trạng thái bệnh ung thư và không ung thư và để sử dụng các polypeptit này và các axit nucleic mã hoá chúng, để tạo ra các chế phẩm hữu ích trong điều chữa bệnh và/hoặc phát hiện bệnh ung thư máu ở động vật có vú.

CD79 là hợp phần tạo tín hiệu của thụ thể tế bào B bao gồm heterodime cùng hoá trị chứa CD79a (IgG, mb-1) và CD79b (IgG, B29). Mỗi CD79a và CD79b chứa miền globulin miễn dịch ngoại bào (Ig), miền chuyển màng và miền tạo tín hiệu nội bào, motif hoạt hoá dựa trên miền thụ thể miễn dịch tyrosin (ITAM). CD79 được biểu hiện trên tế bào B và tế bào u lympho không Hodgkin (NHL) (Cabezudo et al., *Haematologica,* 84:413-418 (1999); D'Arena et al., *Am. J. Hematol.,* 64: 275-281 (2000); Olejniczak et al., *Immunol. Invest.,* 35: 93-114 (2006)). CD79a và CD79b và sIg tất cả cần để biểu hiện bề mặt của CD79 (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.,*

13(3): 270-7)). Sự biểu hiện bề mặt trung bình của CD79b đối với NHL là tương tự với sự biểu hiện trên tế bào B thông thường, nhưng với khoảng lớn hơn (Matsuuchi et al., *Curr. Opin. Immunol.,* 13(3): 270-7 (2001)).

Sự biểu hiện đã nêu của CD79b, có lợi để sản xuất các kháng thể điều trị kháng kháng nguyên CD79b mà tạo ra tính kháng nguyên tối thiểu hoặc không có tính kháng nguyên khi được dùng cho người bệnh, đặc biệt là để điều trị mạn tính. Sáng chế làm thoả mãn các nhu cầu này và các nhu cầu khác. Sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b mà khắc phục được các giới hạn về các chế phẩm điều trị hiện tại cũng như tạo ra các thuận lợi bổ sung mà sẽ được mô tả chi tiết dưới đây.

Sử dụng thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC), nghĩa là các thể liên hợp miễn dịch, để phân phát tại chỗ các chất độc hoặc độc tố tế bào, nghĩa là các dược chất để giết chết hoặc ức chế tế bào khối u trong điều trị bệnh ung thư (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549; Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146; Payne, G. (2003) Cancer Cell 3:207-212; Syrigos and Epenetos (1999) Anticancer Research 19:605-614; Niculescu-Duvaz and Springer (1997) Adv. Drug Del. Rev. 26:151-172; US 4975278) cho phép phân phát đích phần dược chất đến khối u và tích tụ trong nội bào, trong đó việc dùng hệ thống các dược chất không được liên hợp có thể dẫn đến các mức độc tố không mong muốn đối với các tế bào thông thường cũng như tế bào khối u sẽ được loại bỏ (Baldwin et al (1986) Lancet pp. (Mar. 15, 1986):603-05; Thorpe, (1985) "Antibody Carriers Of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review," in Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, A. Pinchera et al (ed.s), pp. 475-506). Các nỗ lực để cải thiện chỉ số điều trị, nghĩa là hiệu quả tối đa và độc tố tối thiểu của ADC đã được tập chung theo tính chọn lọc của các kháng thể đa dòng (Rowland et al (1986) Cancer Immunol. Immunother., 21:183-87) và kháng thể đơn dòng (mAbs) cũng như các đặc tính liên kết dược chất và giải phóng dược chất (Lambert, J. (2005) Curr. Opinion in Pharmacology 5:543-549). Các phần dược chất được sử dụng trong thể liên hợp kháng thể-dược chất bao gồm các độc tố protein vi khuẩn như độc tố diphtheria, độc tố protein thực vật như rixin, các phân tử nhỏ như auristatin, geldanamyxin (Mandler et al (2000) J. of the Nat. Cancer Inst. 92(19):1573-1581; Mandler et al (2000) Bioorganic & Med. Chem. Letters 10:1025-1028; Mandler et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:786-791), maytansinoit (EP 1391213; Liu et al (1996) Proc. Natl. Acad. Sci.

USA 93:8618-8623), calicheamixin (Lode et al (1998) Cancer Res. 58:2928; Hinman et al (1993) Cancer Res. 53:3336-3342), daunomyxin, doxorubixin, methotrexat, và vindesin (Rowland et al (1986) *nêu trên*). Các phần dược chất có thể tác động đến các cơ chế độc tố tế bào bao gồm gắn kết ống, gắn kết ADN hoặc ức chế topoisomeraza. Một số dược chất độc có xu hướng bất hoạt hoặc ít hơn tính khi được liên hợp với các kháng thể lớn hoặc các phối tử thụ thể protein.

Các auristatin peptit, auristatin E (AE) và monometylauristatin (MMAE), các chất tương tự tổng hợp của dolastatin (WO 02/088172), đã được liên hợp như các phần dược chất với: (i) các kháng thể đơn dòng khảm cBR96 (đặc biệt là của Lewis Y đối với bệnh ung thư biểu mô); (ii) cAC10 đặc hiệu đối với CD30 đối với ắc tính tế bào tạo huyết (Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773; Doronina et al (2003) Nature Biotechnology 21(7):778-784; Francisco et al (2003) Blood 102(4):1458-1465; US 2004/0018194; (iii) các kháng thể kháng CD20 như rituxan (WO 04/032828) để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD20 và các rối loạn miễn dịch; (iv) kháng thể kháng EphB2R 2H9 để điều trị bệnh ung thư trực tràng (Mao et al (2004) Cancer Research 64(3):781-788); (v) kháng thể E-selectin (Bhaskar et al (2003) Cancer Res. 63:6387-6394); (vi) trastuzumab (HERCEPTIN®, US 2005/0238649), và (vi) kháng thể kháng CD30 (WO 03/043583). Các biến thể của auristatin E được mô tả trong US 5767237 và US 6124431. Monometyl auristatin E được liên hợp với các kháng thể đơn dòng được mô tả trong Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, presented March 28, 2004. Các chất tương tự auristatin MMAE và MMAF đã được liên hợp với các kháng thể khác nhau (US 2005/0238649).

Các phương pháp gắn thông thường, nghĩa là liên kết thông qua các liên kết cộng hoá trị, phần dược chất kháng kháng thể thường dẫn đến hỗn hợp không đồng nhất của các phân tử trong đó các phần dược chất được gắn ở nhiều vị trí trên kháng thể. Ví dụ, các dược chất độc thường được liên hợp với kháng thể thông qua nhiều gốc lysin thông thường của kháng thể, tạo ra hỗn hợp thể liên hợp kháng thể-dược chất không đồng nhất. Phụ thuộc vào các điều kiện phản ứng, hỗn hợp không đồng nhất thường chứa sự phân bố kháng thể nằm trong khoảng từ 0 đến 8, hoặc nhiều hơn, phần dược chất được gắn vào. Ngoài ra, trong mỗi phân nhóm của các thể liên hợp với tỷ lệ số nguyên của các phần dược chất với kháng thể là hỗn hợp không đồng nhất hiệu lực

trong đó phần dược chất được gắn ở các vị trí khác nhau trên kháng thể. Các phương pháp phân tích và điều chế có thể là không thích hợp để tách và tạo đặc trưng các phân tử kiểu thể liên hợp kháng thể-dược chất trong hỗn hợp không đồng nhất thu được từ phản ứng liên hợp. Các kháng thể là lớn, phức hợp và phân tử sinh học đa dạng về cấu trúc, thường với nhiều nhóm chức phản ứng. Khả năng phản ứng của chúng với các chất phản ứng cầu liên kết và các chất trung gian dược chất-cầu liên kết phụ thuộc vào các yếu tố như độ pH, nồng độ, nồng độ muối và cùng dung môi. Ngoài ra, quy trình liên hợp đa bước có thể không lặp lại do khó kiểm soát điều kiện phản ứng và các chất phản ứng đặc trưng và các chất trung gian.

Xystein thiol là phản ứng ở độ pH trung tính, không giống như hầu hết amin mà được tạo proton và ít ưa nhân gần độ pH = 7. Do nhóm thiol tự do (RSH, sulfhydryl) phản ứng tương đối, protein với các gốc xystein thường tồn tại ở dạng được oxy hoá của chúng như các oligome liên kết disulfua hoặc có các nhóm disulfua tạo cầu nội tại. Các protein ngoại bào thường không có thiol tự do (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London, at page 55). Các nhóm xystein thiol kháng thể thường phản ứng hơn, nghĩa là ưa nhân hơn, theo các chất phản ứng liên hợp ái điện tử so với amin kháng thể hoặc các nhóm hydroxyl. Các gốc xystein đã được đưa vào protein bằng cách kỹ thuật di truyền để tạo thành các gắn kết cộng hoá trị với các phối tử hoặc để tạo thành các liên kết disulfua trong phân tử (Better et al (1994) J. Biol. Chem. 13:9644-9650; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; Greenwood et al (1994) Therapeutic Immunology 1:247-255; Tu et al (1999) Proc. Natl. Acad. Sci USA 96:4862-4867; Kanno et al (2000) J. of Biotechnology, 76:207-214; Chmura et al (2001) Proc. Nat. Acad. Sci. USA 98(15):8480-8484; US 6248564). Tuy nhiên, việc tạo các nhóm xystein thiol bằng cách đột biến các gốc axit amin khác nhau của protein với các axit amin xystein là vấn đề khó giải quyết hiệu lực, cụ thể là trong trường hợp của các gốc không được cặp đôi (Cys tự do) hoặc các gốc mà có thể tiếp cận tương đối đối với phản ứng hoặc oxy hoá. Trong dung dịch cô đặc chứa protein, chất bao E. coli, dịch nổi môi trường nuôi cấy hoặc protein được tinh chế một phần hoặc hoàn toàn, các gốc Cys không cặp đôi trên bề mặt của protein có thể cặp đôi và oxy hoá để tạo thành các disulfua nội phân tử và do đó các protein dime hoặc multime. Việc tạo thành disulfua dime tạo ra Cys mới không phải ứng để liên hợp với dược chất, phối tử hoặc chất đánh dấu khác. Hơn nữa,

nếu protein oxy hoá tạo thành liên kết disulfua nội phân tử nằm giữa Cys được tạo ra mới và gốc Cys đang tồn tại, các nhóm Cys là hiện không có giá trị để tham gia và tương tác vị trí hoạt tính. Hơn nữa, protein có thể tạo ra bất hoạt hoặc không đặc hiệu, bằng cách gấp không đúng hoặc mất cấu trúc bậc ba (Zhang et al (2002) Anal. Biochem. 311:1-9).

Các kháng thể được xử lý bởi xystein đã được xác định là mảnh kháng thể FAB (thioFab) và được biểu hiện như toàn bộ chiều dài, kháng thể đơn dòng IgG (thioMab) (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; US 2007/0092940). Các kháng thể ThioFab và ThioMab đã được liên hợp thông qua các cầu liên kết ở xystein thiol được đưa vào mới với các chất phản ứng cầu liên kết phản ứng thiol và các chất phản ứng cầu liên kết dược chất để tạo thành các thể liên hợp kháng thể-dược chất (Thio ADC).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b hoặc các mảnh chức năng của chúng và phương pháp sử dụng chúng để điều trị khối u tế bào tạo huyết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết, tốt hơn là đặc hiệu, với polypeptit bất kỳ được mô tả trên đây hoặc dưới đây. Tuỳ ý, kháng thể là kháng thể đơn dòng, mảnh kháng thể, bao gồm mảnh Fab, Fab', $F(ab')_2$, và Fv, diabody, kháng thể miền đơn, kháng thể khảm, kháng thể được làm thích hợp với người, kháng thể chuỗi đơn hoặc kháng thể mà ức chế cạnh tranh sự gắn kết của kháng thể kháng CD79b polypeptit với epitop kháng nguyên tương ứng của nó. Các kháng thể theo sáng chế có thể tuỳ ý được liên hợp với chất ức chế phát triển hoặc chất độc tế bào như độc tố, bao gồm, ví dụ, auristatin, maytansinoit, dẫn xuất dolostatin hoặc calicheamixin, chất kháng sinh, chất đồng vị phóng xạ, enzym phân cắt liên kết giữa các nucleotit, hoặc tương tự. kháng thể theo sáng chế có thể tuỳ ý được tạo ra trong các tế bào CHO hoặc tế bào vi khuẩn và tốt hơn là gây chết tế bào mà chúng gắn kết. Đối với mục đích phát hiện, kháng thể theo sáng chế có thể được đánh dấu có thể phát hiện, được gắn vào chất trợ rắn hoặc tương tự.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực hoá trị một (ví dụ, ái lực của kháng thể như mảnh Fab kháng CD79b) hoặc ái lực ở dạng hoá trị hai của nó của kháng thể kháng CD79b (ví dụ ái lực của kháng thể như mảnh IgG kháng CD79b) về căn bản là giống với, thấp

hơn hoặc lớn hơn ái lực hoá trị một hoặc ái lực ở dạng hoá trị hai của nó, tương ứng, của kháng thể của chuột (ví dụ ái lực của kháng thể của chuột như mảnh Fab hoặc như mảnh IgG kháng CD79b) hoặc kháng thể khảm (ví dụ ái lực của kháng thể khảm như mảnh Fab hoặc như mảnh IgG kháng CD79b), bao gồm hoặc về căn bản là bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được mô tả trong các Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,4 nM, 0,2 nM hoặc 0,5 nM.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với CD79b, trong đó kháng thể bao gồm ít nhất là một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự A1-A15, trong đó A1-A15 là KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự B1-B7, trong đó B1-B7 là AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự C1-C9, trong đó C1-C9 là QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1 bao gồm trình tự D1-D10, trong đó D1-D10 là GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2 bao gồm trình tự E1-E18, trong đó E1-E18 là GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) và

(vi) HVR-H3 bao gồm trình tự F1-F10, trong đó F1-F10 là TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể gắn kết với CD79b, trong đó kháng thể bao gồm ít nhất là một biến thể HVR trong đó biến thể trình tự HVR bao gồm cải biến của ít nhất là một gốc của trình tự được mô tả trong SEQ ID NOs: 131, 132, 133, 134, 135 hoặc 136.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 164-166).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 156-158).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 183-185).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 175-177).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 202-204).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 194-196).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 221-223).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 213-215).

Theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm kháng thể kháng CD79b bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng được chọn từ SEQ ID NOs: 170, 189, 208 hoặc 227. Theo khía cạnh khác, sáng chế bao gồm kháng thể kháng CD79b bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ được chọn từ SEQ ID NOs: 169, 188, 207 hoặc 226.

Theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm kháng thể kháng CD79b sinh xystein bao gồm một hoặc nhiều axit amin xystein tự do và trình tự được chọn từ SEQ ID NOs: 251-298. kháng thể kháng CD79b sinh xystein có thể gắn kết với CD79b polypeptit. kháng thể kháng CD79b sinh xystein có thể được bào chế bằng quy trình

bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin của kháng thể kháng CD79b ban đầu bởi xystein.

Theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm kháng thể kháng CD79b sinh xystein bao gồm một hoặc nhiều axit amin xystein tự do trong đó kháng thể kháng CD79b sinh xystein gắn kết với CD79b polypeptit và được bào chế bằng quy trình bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin của kháng thể kháng CD79b ban đầu bởi xystein trong đó kháng thể ban đầu bao gồm ít nhất là một trình tự HVR được chọn từ:

(a) HVR-L1 bao gồm trình tự A1-A15, trong đó A1-A15 là KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131) hoặc KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 137);

(b) HVR-L2 bao gồm trình tự B1-B7, trong đó B1-B7 là AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(c) HVR-L3 bao gồm trình tự C1-C9, trong đó C1-C9 là QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(d) HVR-H1 bao gồm trình tự D1-D10, trong đó D1-D10 là GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(e) HVR-H2 bao gồm trình tự E1-E18, trong đó E1-E18 là GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) và

(f) HVR-H3 bao gồm trình tự F1-F10, trong đó F1-F10 là TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136) hoặc TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 138).

Kháng thể kháng CD79b sinh xystein có thể là kháng thể đơn dòng, mảnh kháng thể, kháng thể khảm, kháng thể được làm thích hợp với người, kháng thể chuỗi đơn hoặc kháng thể mà ức chế cạnh tranh sự gắn kết của kháng thể kháng CD79b polypeptit với epitop kháng nguyên tương ứng của nó. Các kháng thể theo sáng chế có thể tuỳ ý được liên hợp với chất ức chế phát triển hoặc chất độc tế bào như độc tố, bao gồm, ví dụ, auristatin hoặc maytansinoit. kháng thể theo sáng chế có thể tuỳ ý được tạo ra ở tế bào CHO hoặc tế bào vi khuẩn và tốt hơn là ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh hoặc gây chết tế bào mà chúng gắn kết. Đối với mục đích chẩn đoán, kháng thể theo sáng chế có thể được đánh dấu có thể phát hiện, được gắn vào chất trợ rắn hoặc tương tự.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể CD79b (mà, như

được xác định ở đây bao gồm toàn bộ chiều dài và mảnh của chúng), phương pháp này bao gồm biểu hiện ở tế bào chủ thích hợp vectơ tái tổ hợp theo sáng chế mã hoá kháng thể này (hoặc mảnh của chúng) và thu hồi kháng thể này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế hoặc thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế và chất pha loãng, chất mang dược dụng hoặc tá dược.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vật phẩm sản xuất bao gồm vật chứa và chế phẩm được chứa trong vật chứa này, trong đó chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể CD79b theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kit bao gồm vật chứa thứ nhất bao gồm chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể CD79b theo sáng chế; và vật chứa thứ hai bao gồm chất đệm.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc xử dụng kháng thể CD79b theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc xử dụng vật phẩm sản xuất theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc sử dụng kit theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển của tế bào biểu hiện CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế nhờ đó gây ức chế sự phát triển của tế bào này. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị động vật có vú mắc khối u gây bệnh ung thư bao gồm tế bào biểu hiện CD79b, phương pháp này bao gồm cho động vật có vú dùng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó điều trị hiệu quả động vật có vú này. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn tăng sinh tế bào liên quan đến sự biểu hiện gia tăng của CD79b, phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần điều trị này dùng lượng có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó điều trị hoặc ngăn ngừa hiệu quả rối loạn tăng sinh tế bào này. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh ung thư. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển của tế bào, trong đó sự phát triển của tế bào này ít nhất là một phần phụ thuộc vào hiệu quả hiệu lực phát triển của CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với lượng có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó ức chế sự phát triển của tế bào này. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị khối u ở động vật có vú, trong đó sự phát triển của khối u là ít nhất là một phần phụ thuộc vào hiệu quả phát triển hiệu lực của CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với lượng có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó điều trị hiệu quả khối u này. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm cho người bệnh dùng dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây, chất pha loãng, chất mang dược dụng hoặc tá dược.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế tăng sinh tế bào B bao gồm cho tế bào tiếp xúc với thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể theo sáng chế dưới các điều kiện cho phép gắn kết liên hợp miễn dịch với CD79b.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp xác định sự có mặt của CD79b trong mẫu được cho là chứa CD79b, phương pháp này bao gồm cho mẫu này tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế, và xác định sự gắn kết của kháng thể này với CD79b trong mẫu này trong đó việc gắn kết của kháng thể này với CD79b trong mẫu cho biết sự có mặt của protein trong mẫu này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán rối loạn tăng sinh tế bào liên quan đến sự gia tăng ở tế bào, như tế bào B, biểu hiện CD79b, phương

pháp này bao gồm cho tế bào thử nghiệm tiếp xúc với mẫu sinh học với kháng thể bất kỳ trên đây; xác định mức kháng thể được gắn kết với tế bào thử nghiệm trong mẫu bằng cách phát hiện sự gắn kết của kháng thể với CD79b; và so sánh mức kháng thể được gắn kết với tế bào trong mẫu đối chứng, trong đó mức kháng thể được gắn kết được làm bình thường hoá với số lượng tế bào biểu hiện CD79b trong các mẫu thử nghiệm và đối chứng và trong đó mức kháng thể cao hơn được gắn kết trong mẫu thử nghiệm như được so với mẫu đối chứng cho biết sự có mặt của rối loạn tăng sinh tế bào liên quan đến tế bào biểu hiện CD79b.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện CD79b có thể hoà tan trong máu hoặc huyết thanh, phương pháp này bao gồm cho mẫu thử nghiệm của máu hoặc huyết thanh từ động vật có vú được cho là trải qua thử nghiệm rối loạn tăng sinh tế bào B với kháng thể kháng CD79b theo sáng chế và phát hiện gia tăng CD79b có thể hoà tan trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng của máu hoặc huyết thanh từ động vật có vú thông thường.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp gắn kết kháng thể theo sáng chế với tế bào biểu hiện CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig. 1 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 1) của PRO36249 ADN bổ trợ, trong đó SEQ ID NO: 1 là thể đơn dòng được xác định là "DNA225786" (cũng được gọi ở đây là "CD79b"). Trình tự nucleotit mã hoá CD79b với các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc là nét đậm và được gạch chân.

Fig. 2 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 2) có nguồn gốc từ trình tự mã hoá của SEQ ID NO: 1 được thể hiện trong Fig. 1.

Fig. 3 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 3) của chuỗi nhẹ của kháng thể khảm CD79b của chuột (chMA79b) IgG1 (MA79b là kháng thể đơn dòng kháng CD79b của chuột). Trình tự nucleotit mã hoá chuỗi nhẹ của chMA79b với các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc được thể hiện theo nét đậm và được gạch chân.

Fig. 4 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 4), bị mất 18 trình tự tín hiệu axit amin đầu tiên, có nguồn gốc từ trình tự mã hoá của SEQ ID NO: 3 được thể hiện trong Fig. 3. Các vùng biến đổi là các vùng không được gạch chân.

Fig. 5 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 5) của chuỗi nặng của kháng thể khảm của chuột (chMA79b) IgG1 (MA79b là kháng thể đơn dòng kháng CD79b của chuột). Trình tự nucleotit mã hoá chuỗi nặng của chMA79b với các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc được thể hiện theo nét đậm và được gạch chân.

Fig. 6 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 6), bị mất 18 trình tín hiệu axit amin đầu tiên và lysin cuối cùng (K) trước mã bộ ba kết thúc, có nguồn gốc từ trình tự mã hoá của SEQ ID NO: 5 được thể hiện trong Fig. 5. Các vùng biến đổi là các vùng không được gạch chân.

Các Fig. 7A-B thể hiện sự sắp xếp trình tự của các chuỗi nhẹ biến đổi như sau: trình tự liên ứng phân nhóm I kappa chuỗi nhẹ của người (được đánh dấu là "huKI"; SEQ ID NO: 9) với VL-FR1, VL-FR2, VL-FR3, VL-FR4 (SEQ ID NOs: 139-142, tương ứng), kháng thể kháng CD79b của chuột (được đánh dấu là "MA79b"; SEQ ID NO: 10), kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (được đánh dấu là "ghép huMA79b"; SEQ ID NO: 11), biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 17 (được đánh dấu là "huMA79b.v17"; SEQ ID NO: 169), biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 18 (được đánh dấu là "huMA79b.v18"; SEQ ID NO: 188), biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 28 (được đánh dấu là "huMA79b.v28"; SEQ ID NO: 207) và biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 32 (được đánh dấu là "huMA79b.v32"; SEQ ID NO: 226). Các vị trí được đánh số theo Kabat và các vùng siêu biến (HVRs) được ghép từ MA79b với khung liên ứng chuỗi nhẹ biến đổi Kappa I được tạo trong hộp.

Các Fig. 8A-B thể hiện sự sắp xếp trình tự của chuỗi nặng biến đổi như sau: trình tự liên ứng phân nhóm III chuỗi nặng của người (được đánh dấu là "humIII"; SEQ ID NO: 13) với VH-FR1, VH-FR2, VH-FR3, và VH-FR4 (SEQ ID NOs: 143-146), kháng thể kháng CD79b của chuột (được đánh dấu là "MA79b"; SEQ ID NO: 14), kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (được đánh dấu là "mảnh ghép huMA79b"; SEQ ID NO: 15) (chứa 71A, 73T và 78A), biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 17 (được đánh dấu là "huMA79b.v17"; SEQ ID NO: 170) (chứa 71A, 73T và 78A), biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 18 (được đánh dấu là "huMA79b.v18"; SEQ ID NO: 189) (chứa 71A, 73T và 78A), biến thể kháng thể

"được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 28 (được đánh dấu là "huMA79b.v28"; SEQ ID NO: 208) (chứa 71A, 73T và 78A) và biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 32 (được đánh dấu là "huMA79b.v32"; SEQ ID NO: 227) (chứa 71A, 73T và 78A). Các vị trí được đánh số theo Kabat và các vùng siêu biến (HVRs) được ghép từ MA79b với khung liên ứng phân nhóm III chuỗi nặng biến đổi được đóng hộp.

Fig. 9 thể hiện các trình tự HVR khác nhau của biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79bs được chọn (SEQ ID NOs: 17-21) trong đó mỗi biến thể có thay đổi một axit amin trong HVR đơn của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (HVR-L1 (SEQ ID NO: 131); HVR-L2 (SEQ ID NO: 132); HVR-L3 (SEQ ID NO: 133)). Các trình tự của chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bên ngoài các thay đổi axit amin đơn được thể hiện là giống với mảnh ghép huMA79b và không được thể hiện. Không quan sát được các thay đổi trong HVR-H1 (SEQ ID NO: 134), HVR-H2 (SEQ ID NO: 135) hoặc HVR-H3 (SEQ ID NO: 136) của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b.

Fig. 10 thể hiện các trình tự HVR khác nhau của biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79bs được chọn (SEQ ID NOs: 22-106), bao gồm huMA79b L2-2 (cũng được đề cập ở đây là "L2") huMA79b H3-10 (cũng được đề cập ở đây là "H3") trong đó mỗi biến thể có nhiều thay đổi axit amin trong vùng HVR đơn của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (HVR-L2 (SEQ ID NO: 132); HVR-L3 (SEQ ID NO: 133); HVR-H1 (SEQ ID NO: 134); phần của HVR-H3 (SEQ ID NO: 136) là được thể hiện trong Fig. 10 như SEQ ID NO: 107). Các trình tự của các chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi bên ngoài các thay đổi axit amin được thể hiện là giống với mảnh ghép huMA79b và không được thể hiện. Không quan sát được các thay đổi trong HVR-L1 (SEQ ID NO: 131) hoặc HVR-H2 (SEQ ID NO: 135) của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b.

Fig. 11 thể hiện phân tích Biacore của các kháng thể kháng CD79b được chọn, bao gồm kháng thể CD79b của chuột (được đánh dấu là "MA79b"), kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (được đánh dấu là "ghép huMA79b"), và biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79bs, bao gồm huMA79b L2-2 (52R, 53K, 55G, 56R; SEQ ID NO: 22), huMA79b H3-10 (98I, 99R, 100L; SEQ ID NO: 94), huMA79b H1-6 (28P, 30T, 31R, 35N; SEQ ID NO: 57) và

huMA79b L2/H3 (các đột biến L2-2 và H3-10 được mô tả dưới đây) được xác định là các kháng nguyên, bao gồm miền ngoại bào của CD79b của người (huCD79b$_{ecd}$), miền ngoại bào của CD79b của người được dung hợp với Fc (huCD79b$_{ecd}$-Fc) và 16 axit amin peptit chứa epitop đối với MA79b và chMA79b (SEQ ID NO: 16).

Fig. 12 thể hiện phân tích Biacore kháng thể kháng CD79b được chọn, bao gồm kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (được đánh dấu là "ghép huMA79b") và biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79bs (được đánh dấu là 1-34 ở cột thứ nhất hoặc như "tất cả khung" ở cột thứ nhất) với miền ngoại bào của CD79b của người (kháng nguyên huCD79b-ecd). Biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79bs bao gồm biến thể "tất cả khung" trong đó các gốc khung quan trọng hiệu lực của chuột có mặt và các biến thể (được đánh dấu 1-34) với các kết hợp của các đột biến khung có hoặc không có đột biến HVR trong chuỗi nhẹ biến đổi và chuỗi nặng biến đổi như được xác định. Biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 17 (được đề cập ở đây là "huMA79b.v17") là được đánh dấu là 17 ở cột thứ nhất, biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 18 (được đề cập ở đây là "huMA79b.v18") là được đánh dấu là 18 ở cột thứ nhất, biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 28 (được đề cập ở đây là "huMA79b.v28") là được đánh dấu là 28 ở cột thứ nhất và biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 32 (được đề cập ở đây là "huMA79b.v32") là được đánh dấu là 32 ở cột thứ nhất. Nếp gắn kết hoá trị hai được thể hiện là Kd của biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b cụ thể (được đánh dấu là "Kd$_{biến\ thể}$")/Kd của kháng thể khảm MA79b (chMA79b) (được đánh dấu là "Kd$_{khảm}$"); các giá trị dưới cột được đánh dấu "nếp gắn kết hoá trị hai" thể hiện Kd$_{biến\ thể}$/Kd$_{khảm}$. Gắn kết được phát hiện không được xác định trong các Fig. như "NDB".

Các Fig. 13A-B (khung liên ứng chuỗi nặng biến đổi (VH)) và Fig. 14 (khung liên ứng chuỗi nhẹ biến đổi (VL)) mô tả các trình tự khung liên ứng nhận ví dụ của người để sử dụng theo sáng chế với các chất xác định trình tự như sau: (các Fig. 13A-B) khung liên ứng phân nhóm I VH của người trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 108), khung liên ứng phân nhóm I VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOs: 109-111), khung liên ứng phân nhóm II VH của người trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 112), khung liên ứng phân nhóm II VH của người trừ đi các vùng siêu biến

kéo dài (SEQ ID NOs: 113-115), khung liên ứng phân nhóm III VH của người trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 116), khung liên ứng phân nhóm III VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOs: 117-119), khung nhận của người VH trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 120), khung nhận của người VH trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOs: 121-122), khung nhận của người VH 2 trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 123) và khung nhận của người VH 2 trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOs: 124-26) và (Fig. 14) khung liên ứng phân nhóm I kappa VL của người (SEQ ID NO: 127), khung liên ứng phân nhóm II kappa VL của người (SEQ ID NO: 128), khung liên ứng phân nhóm III kappa VL của người (SEQ ID NO: 129) và khung liên ứng phân nhóm IV kappa VL của người (SEQ ID NO: 130).

Các Fig. 15A (chuỗi nhẹ) và 15B (chuỗi nặng) thể hiện các trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế (huMA79b.v17). Các Fig. 15A (chuỗi nhẹ) và 15B (chuỗi nặng) thể hiện các trình tự axit amin của vùng khung (FR), vùng siêu biến (HVR), miền cố định thứ nhất (CL hoặc CH1) và vùng Fc (Fc) của một phương án của kháng thể theo sáng chế (huMA79b.v17) (SEQ ID NOs: 152-159 (Fig. 15A) và SEQ ID NOs: 160-168 (Fig. 15B)). Toàn bộ chiều dài trình tự axit amin (các vùng biến đổi và cố định) của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của huMA79b.v17 đã thể hiện (SEQ ID NO: 303 (Fig. 15A) và 304 (Fig. 15B), tương ứng, với các miền cố định được gạch chân. Các trình tự axit amin của miền biến đổi được thể hiện (SEQ ID NO: 169 (Fig. 15A đối với chuỗi nhẹ) và SEQ ID NO: 170 (Fig. 15B đối với chuỗi nặng)).

Các Fig. 16A (chuỗi nhẹ) và 16B (chuỗi nặng) thể hiện các trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế (huMA79b.v18). Các Fig. 16A (chuỗi nhẹ) và 16B (chuỗi nặng) thể hiện các trình tự axit amin của khung (FR), vùng siêu biến (HVR), miền cố định thứ nhất (CL hoặc CH1) và vùng Fc (Fc) theo một phương án của kháng thể theo sáng chế (huMA79b.v18) (SEQ ID NOs: 171-178 (Fig. 16A) và SEQ ID NOs: 179-187 (Fig. 16B)). Toàn bộ chiều dài trình tự axit amin (các vùng biến đổi và cố định) của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của huMA79b.v18 được thể hiện (SEQ ID NO: 305 (Fig. 16A) và 306 (Fig. 16B), tương ứng, với các miền cố định được gạch chân. Các trình tự axit amin của miền biến đổi được thể hiện (SEQ ID NO: 188 (Fig. 16A đối với chuỗi nhẹ) và SEQ ID NO: 189 (Fig. 16B đối với chuỗi nặng)).

Các Fig. 17A (chuỗi nhẹ) và 17B (chuỗi nặng) thể hiện các trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế (huMA79b.v28). Các Fig. 17A (chuỗi nhẹ) và 17B (chuỗi

nặng) thể hiện các trình tự axit amin của vùng khung (FR), vùng siêu biến (HVR), miền cố định thứ nhất (CL hoặc CH1) và vùng Fc (Fc) của một phương án của kháng thể theo sáng chế (huMA79b.v28) (SEQ ID NOs: 190-197 (Fig. 17A) và SEQ ID NOs: 198-206 (Fig. 17B). Toàn bộ chiều dài trình tự axit amin (các vùng biến đổi và cố định) của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của huMA79b.v28 được thể hiện là (SEQ ID NO: 307 (Fig. 17A) và 308 (Fig. 17B), tương ứng, với các miền cố định được gạch chân. Các trình tự axit min của miền biến đổi được thể hiện là (SEQ ID NO: 207 (các Fig. 7A-B đối với chuỗi nhẹ) và SEQ ID NO: 208 (các Fig. 8A-B đối với chuỗi nặng)).

Các Fig. 18A (chuỗi nhẹ) và 18B (chuỗi nặng) thể hiện các trình tự axit amin của kháng thể theo sáng chế (huMA79b.v32). Các Fig. 18A (chuỗi nhẹ) và 18B (chuỗi nặng) thể hiện các trình tự axit amin của vùng khung (FR), vùng siêu biến (HVR), miền cố định thứ nhất (CL hoặc CH1) và vùng Fc (Fc) củ một phương án của kháng thể theo sáng chế (huMA79b.v32) (SEQ ID NOs: 209-216 (Fig. 18A) và SEQ ID NOs: 217-225 (Fig. 18B). Toàn bộ chiều dài trình tự axit amin (các vùng biến đổi và cố định) của các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của huMA79b.v32 được thể hiện là (SEQ ID NO: 309 (Fig. 18A) và 310 (Fig. 18B), tương ứng, với các miền cố định được gạch chân. Các trình tự axit amin của miền biến đổi được thtể hiện (SEQ ID NO: 226 (Fig. 18A đối với chuỗi nhẹ) và SEQ ID NO: 227 (Fig. 18B đối với chuỗi nặng)).

Fig. 19 thể hiện sự sắp xếp của trình tự axit amin của CD79b từ người (SEQ ID NO: 2), khỉ xynomolgus (xyno) (SEQ ID NO: 7) và chuột (SEQ ID NO: 8). CD79b của người và xyno có 85% axit amin tương đồng. Trình tự tín hiệu, peptit thử nghiệm (11 epitop axit amin đối với MA79b, chMA79b và kháng thể kháng xynoCD79b được mô tả trong Ví dụ 1; ARSEDRYRNPK (SEQ ID NO: 12)), miền chuyển màng (TM) và miền motif hoạt hoá dựa trên thụ thể miễn dịch tyrosin (ITAM) được chỉ định. Vùng được đóng hộp là vùng CD79b mà không có mặt trong biến thể ghép CD79b (được mô tả trong Ví dụ 1).

Fig. 20 là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loại BJAB-luxiferaza mà thể hiện việc dùng các thể kháng CD79b ((a) chMA79b-SMCC-DM1, lượng dược chất là khoảng 2,9 (Bảng 9) và (b) huMA79b L2/H3-SMCC-DM1, lượng dược chất khoảng 2,4 (Bảng 9)) kháng chuột SCID có các khối u tế bào B của người được ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các đối chứng bao gồm Herceptin® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (kháng HER2-SMCC-DM1).

Fig. 21A là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo trong mô hình ghép khác loài Granta-519 (u bạch huyết tế bào vỏ của người) mà thể hiện việc sử dụng các kháng thể kháng CD79b ((a) chMA79b-SMCC-DM1, lượng dược chất là khoảng 3,6 (Bảng 10), (b) huMA79b.v17-SMCC-DM1, lượng dược chất là khoảng 3,4 (Bảng 10), (c) huMA79b.v28-SMCC-DM1, lượng dược chất là khoảng 3,3 hoặc 3,4 (Bảng 10), (d) huMA79b.v18-SMCC-DM1, lượng dược chất là khoảng 3,4 (Bảng 10) và (e) huMA79b.v32-SMCC-DM1, lượng dược chất là khoảng 2,9 (Bảng 10)) kháng chuột SCID có khối u tế bào B của người ức chế đáng kết sự phát triển khối u. Các đối chứng bao gồm Herceptin® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (kháng HER2-SMCC-DM1). Fig. 21B là biểu đồ thay đổi phần trăm khối lượng ở chuột từ nghiên cứu ghép khác loài Granta-519 (Fig. 21A và Bảng 10) thể hiện là thay đổi không đáng kể theo khối lượng trong thời gian 7 ngày thứ nhất của nghiên cứu. "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người và "ch" đề cập đến kháng thể khảm.

Fig. 22 thể hiện sự mô tả thể liên hợp kháng thể-dược chất kháng CD79b sinh xystein (ADC) trong đó phần dược chất được gắn vào nhóm xystein được sinh ra: chuỗi nhẹ (LC-ADC); chuỗi nặng (HC-ADC); và vùng Fc (Fc-ADC).

Fig. 23 thể hiện các bước: (i) khử sản phẩm cộng xystein disulfua và các disulfua trong chuỗi trong kháng thể kháng CD79b sinh xystein (ThioMab) với chất khử TCEP (tris(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua); (ii) oxy hoá một phần, nghĩa là oxy hoá lại để lại tạo thành các disulfua trong chuỗi với dhAA (axit dehydroascorbic); và (iii) thể liên hợp của kháng thể được oxy hoá lại với chất trung gian dược chất-cầu liên kết để tạo thành thể liên hợp dược chất xystein kháng CD79b (ADC).

Fig. 24 thể hiện (A) trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 229) và (B) trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 228) của kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b (thio-huMA79b.v17-HC-A118C), trong đó alanin ở vị trí 118 EU (alanin vị trí trình tự 118; Kabat vị trí 114) của chuỗi nặng được thay đổi thành xystein. Phần dược chất có thể được gắn vào nhóm xystein được sinh ra trong chuỗi nặng. Trong mỗi hình vẽ, axit amin được thay đổi là được thể hiện theo nét đậm gạch dưới. Gạch chân đơn cho biết các vùng cố định. Các vùng biến đổi là các vùng không được gạch chân. Vùng Fc được đánh dấu chữ nghiêng. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 25 thể hiện (A) trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 231) và (B) trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 230) của kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b được làm thích hợp với người (thio-huMA79b.v18-HC-A118C), trong đó alanin ở vị trí EU 118 (alanin vị trí sau đó 118; Kabat vị trí 114) của chuỗi nặng được thay đổi thành xystein. Phần dược chất có thể được gắn vào nhóm xystein được sinh ra trong chuỗi nặng. Trong mỗi hình vẽ, axit amin được thay đổi là được thể hiện theo nét đậm với đường gạch chân kép. Nét gạch chân đơn cho biết các vùng cố định. Các vùng biến đổi là các vùng không được gạch chân. Vùng Fc được đánh dấu bởi chữ nghiêng. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 26 thể hiện (A) trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 233) và (B) trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 232) kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b được làm thích hợp với người (thio-huMA79b.v28-HC-A118C), trong đó alanin ở vị trí EU 118 (vị trí sau đó alanin 118; Kabat vị trí 114) của chuỗi nặng được thay đổi thành xystein. Phần dược chất có thể được gắn vào nhóm xystein trong chuỗi nặng. Trong mỗi hình vẽ, axit amin được thay đổi được thể hiện theo nét đậm với đường gạch chân kép. Đường gạch chân đơn cho biết các vùng cố định. Các vùng biến đổi là các vùng không được gạch chân. Vùng Fc được đánh dấu theo chữ nghiêng. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 27 thể hiện (A) trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 235) và (B) trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 234) của kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b (thio-MA79b-LC-V205C), valin ở vị trí Kabat 205 (Valin vị trí sau đó 209) của chuỗi nhẹ được thay đổi thành xystein. Phần dược chất có thể được gắn vào nhóm xystein được sinh ra trong chuỗi nhẹ. Trong mỗi hình vẽ, axit amin được sinh ra là được thể hiện theo nét đậm với đường gạch chân kép. Đường gạch chân đơn cho biết các vùng cố định. Các vùng cố định là các vùng không được gạch chân. Vùng Fc được đánh dấu bởi chữ nghiêng. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein.

Fig. 28 thể hiện (A) trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 237) và (B) trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 236) của kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b (thio-MA79b-HC-A118C), trong đó alanin ở vị trí EU 118 (vị trí alanin sau đó 118; Kabat vị trí 114) của chuỗi nặng được thay đổi thành xystein. Phần dược chất có thể được

gắn vào nhóm xystein được sinh ra trong chuỗi nặng. Trong mỗi hình vẽ, axit amin được thay đổi là được thể hiện theo nét đậm với đường gạch chân kép. Đường gạch chân đơn cho biết các vùng cố định. Các vùng biến đổi là các vùng không được gạch chân. Vùng Fc được đánh dấu chữ nghiêng. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein.

Các Fig. 29A-B là các biểu đồ FACS cho biết việc gắn kết của các thể liên hợp dược chất kháng CD79b thioMAb (TDCs) theo sáng chế gắn kết với CD79b được biểu hiện trên bề mặt của tế bào BJAB-luxiferaza là tương tự đối với biến thể được liên hợp (A) LC (V205C) thioMAb và các biến thể (B) HC (A118C) thioMAb của chMA79b với MMAF. Việc phát hiện với MS kháng IgG-PE của người. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein.

Các Fig. 30A-D là các biểu đồ FACS cho biết rằng việc gắn kết của các thể liên hợp dược chất kháng CD79b thioMAb (TDCs) theo sáng chế gắn kết với CD79b được biểu hiện trên bề mặt của tế bào BJAB-luxiferaza tương tự với (A) các biến thể (không được liên hợp) HC (A118C) thioMAb của huMA79b.v18 và các biến thể HC (A118C) thioMAb được liên hợp của huMA79b.v18 với các thể liên hợp dược chất khác nhau thể hiện ((B) MMAF, (C) MMAE và (D) DM1)). Việc phát hiện với MS kháng IgG-PE của người. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Các Fig. 31A-D các biểu đồ FACS cho biết việc gắn kết với các thể liên hợp dược chất kháng CD79b thioMAb (TDC) theo sáng chế gắn kết với CD79b được biểu hiện trên bề mặt của tế bào BJAB-luxiferaza là tương tự với (A) các biến thể trần (không được liên hợp) HC (A118C) thioMAb của huMA79b.v28 và các biến thể HC (A118C) thioMAb không được liên hợp của huMA79b.v28 với các thể liên hợp dược chất khác nhau thể hiện ((B) MMAE, (C) DM1 và (D) MMAF)). Việc phát hiện với MS kháng PE của người. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Các Fig. 32A-D các biểu đồ FACS cho biết rằng việc gắn kết của các thể liên hợp dược chất kháng xynoCD79b thioMab (TDCs) theo sáng chế gắn kết với CD79b được biểu hiện trên bề mặt của tế bào BJAB biểu hiện xynoCD79b là tương tự với (A) các biến thể trần (không được liên hợp) HC(A118C) thioMAb của xynoCD79b (ch10D10) và các biến thể HC(A118C) thioMAb không được liên hợp của kháng

xynoCD79b (ch10D10) với các thể liên hợp dược chất khác nhau thể hiện ((B) MMAE, (C) DM1 và (D) MMAF)). Việc phát hiện là với MS kháng huIgG-PE. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein.

Fig. 33A là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài Granta-519 (u bạch huyết tế bào vỏ của người) mà thể hiện việc dùng kháng CD79b TDC mà được thay đổi bởi vị trí của xystein được sinh ra (LC (V205C) hoặc HC (A118C)) và/hoặc các liều dược chất khác với chuột SCID có khối u tế bào B của người ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1.9 (Bảng 11) hoặc thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1,8 (Bảng 11) thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm hu-kháng-HER2-MC-MMAF và thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF và chMA79b-MC-MMAF. Fig. 33B là biểu đồ ngăn ngừa thay đổi khối lượng ở chuột từ nghiên cứu ghép khác loài Granta-519 (Fig. 33A và Bảng 11) thể hiện rằng không có thay đổi đáng kể theo khối lượng trong thời gian 14 ngày đầu tiên của nghiên cứu. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 34A là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài BJAB-luxiferaza (u lympho Burkitt) mà thể hiện rằng việc dùng kháng CD79b TDC được liên hợp với các phần dược chất cầu liên kết khác nhau (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 hoặc MC-MMAF) kháng chuột SCID có các khối u tế bào B của người, ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, lượng dược chất là khoảng 1,87 (Bảng 12), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 12), hoặc thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1,95 (Bảng 12), thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm các đối chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), các đối chứng huMA79b.v28 (huMA79b.v28-SMCC-DM1 và thio huMA79b.v28-HC(A118C)) và các đối chứng kháng CD22 (thio hu-kháng-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF). Fig. 34B là biểu đồ thay đổi phần trăm khối lượng ở chuột từ nghiên cứu ghép khác loài BJAB-

luxiferaza (Fig. 34A và Bảng 12) thể hiện rằng không có thay đổi đáng kể theo khối lượng trong thời gian 7 ngày thứ nhất của nghiên cứu này. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 35A là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài WSU-DLCL2 (Khuếch tán u lympho tế bào lớn) thể hiện rằng việc dùng kháng CD79b TDC được liên hợp với các phần dược chất cầu liên kết khác nhau (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 hoặc MC-MMAF) kháng chuột SCID có các khối u tế bào B của người ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, lượng dược chất là khoảng 1,87 (Bảng 13), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 13), hoặc thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1.95 (Bảng 13), thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm các đối chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), các đối chứng huMA79b.v28 (huMA79b.v28-SMCC-DM1 và thio huMA79b.v28-HC(A118C)) và các đối chứng kháng CD22 (thio hu-kháng-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF). Fig. 35B là biểu đồ thay đổi phần trăm khối lượng ở chuột từ nghiên cứu ghép khác loài WSU-DLCL2 (Fig. 35A và Bảng 13) thể hiện không có thay đổi đáng kể theo khối lượng trong thời gian 7 ngày đầu tiên của nghiên cứu. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 36 là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài DOHH2 (u lympho dạng nang) mà thể hiện dùng kháng CD79b TDC được liên hợp với các phần dược chất cầu liên kết khác nhau (BMPEO-DM1, MC-MMAF hoặc MCvcPAB-MMAE) với chuột SCID có khối u tế bào B của người ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-BMPEO-DM1 (lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 14)), thio huMA79b.v28-MC-MMAF (lượng dược chất là khoảng 1,95 (Bảng 14)) hoặc thio MA79b-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (lượng dược chất là khoảng 1,87 (Bảng 14)) thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm các đối

chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), các đối chứng huMA79b.v28 (huMA79b.v28-SMCC-DM1 và thio huMA79b.v28-HC(A118C)) và các đối chứng kháng CD22 (thio hu-kháng-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF). "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 37 là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài BJAB-luxiferaza (u lympho Burkitt) mà thể hiện việc dùng kháng CD79b TDC được liên hợp với các phần cầu liên kết dược chất khác nhau (MCvcPAB-MMAE, BMPEO-DM1 hoặc MC-MMAF) và/hoặc được dùng ở các liều khác nhau như được thể hiện với chuột SCID có các khối u tế bào B của người, ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 15), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, lượng dược chất là khoảng 1,9 (Bảng 15), hoặc thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1,9 (Bảng 15) thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm tá dược (riêng chất đệm), các đối chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE), các đối chứng huMA79b.v28 (thio huMA79b.v28-HC(A118C)) và các đối chứng khán CD22 (thio hu-kháng-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF). "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 38A là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài Granta-619 (u bạch huyết tế bào vỏ của người) mà thể hiện việc dùng kháng CD79b TDC được liên hợp với các phần dược chất cầu liên kết khác nhau (BMPEO-DM1 hoặc MC-MMAF) và/hoặc được dùng ở các liều khác nhau như được thể hiện với chuột SCID có các khối u tế bào B của người, ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 16), hoặc thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1,95 (Bảng 16), thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm các đối chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-

kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). Fig. 38B là đồ thị thay đổi phần trăm khối lượng ở chuột từ nghiên cứu ghép khác loài Granta-519 (Fig. 38A và Bảng 16) thể hiện không có thay đổi đáng kể theo khối lượng trong thời gian 14 ngày đầu tiên của nghiên cứu. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 39 là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài WSU-DLCL2 (Khuếch tán u lympho tế bào lớn) mà thể hiện việc dùng kháng CD79b TDC được liên hợp với các phần dược chất cầu liên kết khác nhau (BMPEO-DM1, MC-MMAF hoặc MCvcPAB-MMAE) và/hoặc được dùng ở các liều khác nhau như được thể hiện với chuột SCID có khối u tế bào B của người, ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 17), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1,9 (Bảng 17) hoặc thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, lượng dược chất là khoảng 1,9 (Bảng 17), thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm tá dược (riêng chất đệm) và các đối chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 40 là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài Granta-519 (u bạch huyết tế bào vỏ của người) mà thể hiện việc dùng kháng CD79b TDC được liên hợp với các phần dược chất cầu liên kết khác nhau (BMPEO-DM1 hoặc MCvcPAB-MMAE) và/hoặc được dùng ở các liều khác nhau như được thể hiện với chuột SCID có khối u tế bào B của người, ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 18) hoặc thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, lượng dược chất là khoảng 1,87 (Bảng 18), thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm các đối chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). "Thio" đề cập đến kháng thể

được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 41 thể hiện đồ thị các kết quả thử nghiệm tăng sinh tế bào in vitro với (A) BJAB, (B) Granta-519 hoặc (C) tế bào khối u WSU-DLCL2, được xử lý với các nồng độ nằm trong khoảng từ 0,001 đến 10000 ng TDC/ml, bao gồm: (1) đối chứng thio hu kháng-gD-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, lượng 2,0 MMAE/Ab, (2) đối chứng thio hu kháng-gD-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng 2,1 MMAF/Ab, (3) đối chứng thio hu kháng-gD-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng 2,1 DM1/Ab, (4) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng 1,91 MMAF/Ab, (5) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng 1,8 DM1/Ab và (6) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, lượng 2,0 MMAE/Ab. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người. "gD" đề cập đến glycoprotein D.

Fig. 42 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 238) của PRO283627 ADN bổ trợ, trong đó SEQ ID NO: 235 là thể đơn dòng được xác định là "DNA548455" (cũng được đề cập ở đây là "xyno CD79b"). Trình tự nucleotit mã hoá xynomolgus CD79b với các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc được thể hiện theo nét đậm và được gạch chân.

Fig. 43 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 239) có nguồn gốc từ trình tự mã hoá của SEQ ID NO: 235 được thể hiện trong Fig. 42.

Fig. 44 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 240) của chuỗi nhẹ của kháng thể kháng xyno CD79b (ch10D10). Trình tự nucleotit mã hoá chuỗi nhẹ của kháng thể kháng xyno CD79b (ch10D10) với các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc được thể hiện theo nét đậm và được gạch chân.

Fig. 45 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 241), bị bỏ qua trình tự tín hiệu 18 axit amin thứ nhất, có nguồn gốc từ trình tự mã hoá của SEQ ID NO: 240 được thể hiện trong Fig. 44. Các vùng biến đổi (SEQ ID NO: 302) là các vùng không được gạch chân.

Fig. 46 thể hiện trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 242) của chuỗi nặng của kháng thể kháng xyno CD79b (ch10D10). Trình tự nucleotit mã hoá chuỗi nặng của kháng thể kháng xyno CD79b (ch10D10) với các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc được thể hiện theo nét đậm và được gạch chân.

Fig. 47 thể hiện trình tự axit amin (SEQ ID NO: 243), bị bỏ qua trình tự tính hiệu 18 axit amin thứ nhất và lysin cuối cùng (K) trước mã bộ ba kết thúc, có nguồn gốc từ trình tự mã hoá của SEQ ID NO: 242 được thể hiện trong Fig. 46. Các vùng biến đổi (SEQ ID NO: 301) là các vùng không được gạch chân.

Fig. 48 thể hiện (A) trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 245) và (B) trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 244) của kháng thể được xử lý bởi xystein kháng xyno CD79b (Thio-kháng-xynoCD79b-HC-A118C), trong đó alanin ở vị trí EU 118 (vị trí alanin sau đó 118; Kabat vị trí 114) của chuỗi nặng được thay đổi thành xystein. Axit amin D ở vị trí EU 6 (được bóng mờ trong các Fig.) của chuỗi nặng có thể thay đổi bởi E. Phần dược chất có thể được gắn vào nhóm xystein được sinh ra trong chuỗi nặng. Trong mỗi hình vẽ, axit amin được thay đổi được thể hiện theo nét đậm với được gạch chân kép. Đường gạch chân đơn cho biết các vùng cố định. Các vùng biến đổi là các vùng không được gạch chân. Vùng Fc được đánh dấu bởi chữ nghiêng. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein.

Fig. 49 thể hiện (A) trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 300) và (B) trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 299) của kháng thể được xử lý bởi xystein kháng xyno CD79b (Thio-kháng-xynoCD79b-LC-V205C), trong đó valin ở Kabat vị trí 205 (vị trí sau đó Valin 209) của chuỗi nhẹ được thay đổi thành xystein. Axit amin D ở vị trí EU 6 (được tạo bóng mờ trong Fig.) của chuỗi nặng có thể thay đổi bởi E. Phần dược chất có thể được gắn với nhóm xystein được sinh ra trong chuỗi nặng. Trong mỗi hình vẽ, axit amin được thay đổi được thể hiện theo nét đậm với đường gạch chân kép. Đường gạch chân đơn cho biết các vùng cố định. Các vùng biến đổi là các vùng không được gạch chân. Vùng Fc được đánh dấu bởi chẽ nghiêng. "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein.

Fig. 50 là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài BJAB-xynoCD79b (các tế bào BJAB biểu hiện xynoCD79b) (u lympho Burkitt) mà thể hiện việc dùng kháng CD79b TDC được liên hợp với các phần dược chất cầu liên kết khác nhau (BMPEO-DM1, MC-MMAF hoặc MCvcPAB-MMAE) với chuột SCID có khối u tế bào B của người, ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 19), thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1,9 (Bảng 19), hoặc thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-

MMAE, lượng dược chất là khoảng 1,9 (Bảng 19), thio kháng-xyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,8 (Bảng 19), thio kháng-xyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF, lượng dược chất là khoảng 1,9 (Bảng 19) hoặc thio kháng-xyno CD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, lượng dược chất là khoảng 1,86 (Bảng 19), thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm các đối chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Fig. 51 là đồ thị ức chế sự phát triển khối u in vivo ở mô hình ghép khác loài BJAB-xynoCD79b (các tế bào BJAB biểu hiện xynoCD79b) (u lympho Burkitt) mà thể hiện việc dùng kháng CD79b TDC với phần dược chất cầu liên kết BMPEO-DM1 được dùng ở các liều khác nhau như được thể hiện, với chuột SCID có khối u tế bào B của người, ức chế đáng kể sự phát triển khối u. Các mô hình ghép khác loài được xử lý với thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,85 (Bảng 20) hoặc thio kháng-xyno (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, lượng dược chất là khoảng 1,8 (Bảng 20), thể hiện ức chế đáng kể sự phát triển khối u trong thời gian nghiên cứu. Các đối chứng bao gồm các đối chứng kháng HER2 (thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1) và các đối chứng huMA79b.v28 (thio huMA79b.v28-HC(A118C) và các đối chứng kháng xynoCD79b(ch10D10) (thio kháng xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)). "Thio" đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

Mô tả chi tiết sáng chế

Sáng chế đề xuất phương pháp, chế phẩm, kit và vật phẩm sản xuất để nhận biết các chế phẩm hữu ích để điều trị khối u tế bào tạo huyết ở động vật có vú và phương pháp sử dụng các chế phẩm này để điều trị khối u này.

Các chi tiết về các phương pháp, chế phẩm, kit và vật phẩm sản xuất được đề xuất ở đây.

I. Các kỹ thuật chung

Thực tiễn sáng chế sẽ dùng, trừ phi được quy định khác, các kỹ thuật thông thường của sinh học phân tử (bao gồm các kỹ thuật tái tổ hợp), vi sinh vật, sinh học tế

bào, hoá sinh và miễn dịch, mà đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các kỹ thuật này được giải thích đầy đủ trong tài liệu chuyên ngành, như, "Molecular Cloning: A Laboratory Manual", xuất bản lần thứ hai (Sambrook et al., 1989); "Oligonucleotide Synthesis" (M. J. Gait, ed., 1984); "Animal Cell Culture" (R. I. Freshney, ed., 1987); "Methods in Enzymology" (Academic Press, Inc.); "Current Protocols in Molecular Biology" (F. M. Ausubel et al., eds., 1987, and periodic updates); "PCR: The Polymerase Chain Reaction", (Mullis et al., ed., 1994); "A Practical Guide to Molecular Cloning" (Perbal Bernard V., 1988); "Phage Display: A Laboratory Manual" (Barbas et al., 2001).

II. Định nghĩa

Nhằm mục đích giải thích sáng chế, các định nghĩa sau đây sẽ áp dụng và nếu thích hợp, các thuật ngữ được dùng theo nghĩa đơn cũng sẽ bao gồm nhiều nghĩa và ngược lại. Trong trường hợp mà định nghĩa bất kỳ được nêu trái ngược với tài liệu bất kỳ được kết hợp ở đây bằng cách tham khảo, định nghĩa được nêu dưới đây sẽ điều chỉnh.

"Chất đánh dấu bề mặt tế bào B" hoặc "kháng nguyên bề mặt tế bào B" ở đây là kháng nguyên được biểu hiện trên bề mặt của tế bào B mà có thể được tạo đích với chất đối kháng mà gắn kết với nó, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn đến, các kháng thể kháng kháng nguyên bề mặt tế bào B hoặc có thể hoà tan tạo thành kháng nguyên bề mặt tế bào B có khả năng đối kháng sự gắn kết của phối tử với kháng nguyên tế bào B xuất hiện tự nhiên. Các chất đánh dấu bề mặt tế bào B ví dụ bao gồm các chất đánh dấu bề mặt tế bào bạch cầu CD10, CD19, CD20, CD21, CD22, CD23, CD24, CD37, CD40, CD53, CD72, CD73, CD74, CDw75, CDw76, CD77, CDw78, CD79a, CD79b, CD80, CD81, CD82, CD83, CDw84, CD85 và CD86 (để mô tả, xem The Leukocyte Antigen Facts Book, 2nd Edition. 1997, ed. Barclay et al. Academic Press, Harcourt Brace & Co., New York). Các chất đánh dấu bề mặt tế bào B khác bao gồm RP105, FcRH2, B-cell CR2, CCR6, P2X5, HLA-DOB, CXCR5, FCER2, BR3, BAFF, BLyS, Btig, NAG14, SLGC16270, FcRH1, IRTA2, ATWD578, FcRH3, IRTA1, FcRH6, BCMA, và 239287. Chất đánh dấu bề mặt tế bào B đặc biệt quan tâm ưu tiên được biểu hiện trên tế bào B được so với mô không tế bào B khác của động vật có vú và có thể được biểu hiện trên tế bào B tiền chất và tế bào B trưởng thành.

Thuật ngữ "CD79b", như được sử dụng ở đây, đề cập đến CD79b nguyên gốc bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm động vật có vú như động vật linh trưởng (ví dụ con người, khỉ xynomolgus (xyno)) và động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột đồng và chuột nhà), trừ phi được chỉ định khác. CD79b của người cũng được đề cập ở đây là "PRO36249" (SEQ ID NO: 2) và được mã hoá bởi trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 1) cũng được đề cập ở đây là "DNA225786". Xynomologus CD79b là cũng được đề cập ở đây là "xyno CD79b" hoặc "PRO283627" (SEQ ID NO: 239) và được mã hoá bởi trình tự nucleotit (SEQ ID NO: 238) cũng được đề cập ở đây là "DNA548455". Thuật ngữ "CD79b" bao gồm "toàn bộ chiều dài" CD79b không được xử lý cũng như dạng bất kỳ của CD79b mà là kết quả của quy trình trong tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể xuất hiện tự nhiên của CD79b, ví dụ, biến thể ghép, các biến thể alen và các isoform. CD79b polypeptit được mô tả ở đây có thể được phân lập từ nhiều nguồn, như từ các loại mô của người hoặc từ nguồn khác hoặc được bào chế theo các phương pháp tái tổ hợp hoặc tổng hợp. "Trình tự CD79b polypeptit nguyên gốc" bao gồm polypeptit có trình tự axit amin giống như CD79b polypeptit tương ứng có nguồn gốc từ tự nhiên. Trình tự CD79b polypeptit nguyên gốc này có thể được phân lập từ tự nhiên hoặc có thể được tạo ra bởi các phương pháp tái tổ hợp hoặc tổng hợp. Thuật ngữ "trình tự CD79b polypeptit nguyên gốc" đặc biệt bao gồm các dạng được cắt hoặc được tiết xuất hiện tự nhiên của CD79b polypeptit đặc hiệu (*ví dụ*, trình tự miền ngoại bào), các dạng biến thể xuất hiện tự nhiên (*ví dụ,* các dạng được ghép khác) và các biến thể alen xuất hiện tự nhiên của polypeptit. Theo một số phương án theo sáng chế, trình tự CD79b polypeptit nguyên gốc được mô tả ở đây là trình tự polypeptit trưởng thành hoặc nguyên gốc toàn bộ chiều dài bao gồm toàn bộ chiều dài trình tự axit amin được thể hiện trong các Fig. kèm theo. Các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc (nếu được chỉ định) là được thể hiện theo kiểu chữ đậm và không được gạch chân trong các Fig.. Các gốc axit nucleic được nêu là "N" trong các Fig. kèm theo là gốc axit nucleic bất kỳ. Tuy nhiên, trong khi CD79b polypeptit được mô tả trong các Fig. kèm theo được thể hiện là bắt đầu với gốc methionin được xác định ở đây là axit amin vị trí 1 trong các hình vẽ, có thể hiểu được và có khả năng rằng các gốc methionin khác được định vị ngược dòng hoặc xuôi dòng từ axit amin vị trí 1 trong các Fig. có thể được dùng làm gốc axit amin khởi đầu đối với CD79b polypeptit.

"MA79b" hoặc "kháng thể CD79b của chuột" hoặc "kháng thể kháng CD79b của chuột" được sử dụng ở đây đặc biệt đề cập đến kháng thể đơn dòng kháng CD79b của chuột trong đó kháng thể đơn dòng kháng CD79b của chuột bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 10 (các Fig. 7A-B) và miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 14 (các Fig. 8A-B). kháng thể đơn dòng kháng CD79b của chuột có thể được mua từ các nguồn hiện có bán trên thị trường như Biomeda (kháng thể kháng CD79b của người; Foster City, CA), BDbioscience (kháng thể kháng CD79b của người; San Diego, CA) hoặc Ancell (kháng thể kháng CD79b của người; Bayport, MN) hoặc được sinh ra từ thể đơn dòng lai 3A2-2E7 American Type Culture Collection (ATCC) số lưu giữ HB11413, được lưu giữ với ATCC ngày 20/7/1993.

"chMA79b" hoặc "kháng thể khảm MA79b" được sử dụng ở đây đặc biệt đề cập đến kháng thể khảm kháng CD79b của người (như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 11/462,336, nộp ngày 3/8/2006) trong đó kháng thể khảm kháng CD79b bao gồm chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 4 (Fig. 4). Chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 4 còn bao gồm miền biến đổi của SEQ ID NO: 10 (các Fig. 7A-B) và miền cố định chuỗi nhẹ của IgG1 của người. kháng thể khảm kháng CD79b còn bao gồm chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6 (Fig. 6). Chuỗi nặng của SEQ ID NO: 6 còn bao gồm miền biến đổi của SEQ ID NO: 14 (các Fig. 8A-B) và miền cố định chuỗi nặng của IgG1 của người.

"Kháng xynoCD79b" hoặc "kháng xyno CD79b" được sử dụng ở đây đề cập đến các kháng thể gắn kết với xyno CD79b (SEQ ID NO: 239 của Fig. 43) (như được mô tả trước trong đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 11/462,336, nộp ngày 3/8/2006). "Kháng xynoCD79b(ch10D10)" hoặc "ch10D10" được sử dụng ở đây đề cập đến kháng thể khảm kháng xynoCD79b (như được mô tả trước trong đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 11/462,336, nộp ngày 3/8/2006) mà gắn kết với xynoCD79b (SEQ ID NO: 239 của Fig. 43). Kháng xynoCD79b(ch10D10) hoặc ch10D10 là kháng thể khảm kháng xynoCD79b mà bao gồm chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 241 (Fig. 45). Kháng xynoCD79b(ch10D10) hoặc ch10D10 còn bao gồm chuỗi nặng của SEQ ID NO: 243 (Fig. 47).

"Ghép MA79b" hoặc "kháng thể 'được làm thích hợp với người' được ghép MA79b" hoặc "ghép huMA79b" được sử dụng ở đây đặc biệt đề cập đến mảnh ghép được tạo ra bằng cách ghép các vùng siêu biến từ kháng thể kháng CD79b của chuột

(MA79b) vào VL kappa I liên ứng của người nhận (huKI) và liên ứng phân nhóm III VH của người (huIII) với R71A, N73T và L78A (Carter et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA,* 89:4285 (1992)) (xem Ví dụ 1A và các Fig. 7 (SEQ ID NO: 11) và 8 (SEQ ID NO: 15)).

"Cải biến" gốc/vị trí axit amin, như được sử dụng ở đây, đề cập đến sự thay đổi của trình tự axit amin sơ cấp như được so với trình tự axit amin khởi đầu, trong đó thay đổi này là kết quả của sự thay đổi trình tự bao gồm gốc/vị trí axit amin. Ví dụ, các cải biến thường bao gồm thay thế gốc (hoặc ở vị trí này) với axit amin khác (ví dụ, thay thế bảo tồn hoặc không bảo tồn), việc lồng một hoặc nhiều (thường ít hơn 5 hoặc 3) axit amin liền kề với gốc/vị trí này và loại bỏ gốc/vị trí này. "Thay thế axit amin", hoặc biến thể của nó, đề cấp đến sự thay thế của gốc axit amin đang tồn tại trong trình tự axit amin được xác định trước (khởi đầu) với gốc axit amin khác nhau. Thông thường và tốt hơn là, các cải biến này dẫn đến thay đổi ít nhất là một hoạt tính hoá sinh lý của polypeptit biến thể được so với polypeptit bao gồm trình tự axit amin khởi đầu (hoặc "kiểu dại"). Ví dụ, trong trường hợp của kháng thể, hoạt tính hoá sinh lý mà được thay đổi có thể là ái lực gắn kết, khả năng gắn kết và/hoặc hiệu quả gắn kết trên phân tử đích.

Thuật ngữ "kháng thể" được sử dụng với nghĩa rộng nhất và đặc biệt bao gồm, ví dụ các kháng thể đơn dòng kháng CD79b đơn (bao gồm các kháng thể đơn dòng chủ vận, đối kháng, làm trung tính, toàn bộ chiều dài hoặc nguyên vẹn), các chế phẩm kháng thể kháng CD79b với tính đặc hiệu polyepitop, kháng thể đa dòng, kháng thể đa hoá trị, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ các kháng thể đặc hiệu kép miễn là chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn), được tạo thành từ ít nhất là hai kháng thể nguyên vẹn, kháng thể chuỗi đơn kháng CD79b và các mảnh của các kháng thể kháng CD79b (xem dưới đây), bao gồm các mảnh Fab, Fab', $F(ab')_2$ và Fv, các diabody, các kháng thể miền đơn (sdAbs), miễn là chúng thể hiện hoạt tính sinh học hoặc miễn dịch mong muốn. Thuật ngữ "globulin miễn dịch" (Ig) được sử dụng có thể thay thế cho nhau với kháng thể ở đây. kháng thể có thể là của người, được làm thích hợp với người và/hoặc trưởng thành ái lực.

Thuật ngữ "kháng thể kháng CD79b" hoặc "kháng thể gắn kết với CD79b" đề cập đến kháng thể mà có khả năng gắn kết CD79b với ái lực đủ sao cho kháng thể là hữu ích làm chất chẩn đoán và/hoặc điều trị CD79b đích. Tốt hơn là, mức độ gắn kết

của kháng thể kháng CD79b với protein không CD79b không liên quan ít hơn khoảng 10% gắn kết của kháng thể với CD79b như được xác định, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA). Theo một số phương án, kháng thể gắn kết với CD79b có hằng số phân ly (Kd) ≤ 1 nM, ≤ 100 nM, ≤ 10 nM, ≤ 1 nM, hoặc ≤ 0,1nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD79b gắn kết với epitop của CD79b mà được bảo tồn theo CD79b từ các loài khác nhau.

"Kháng thể được phân lập" là kháng thể mà được nhận biết và được tách và/hoặc thu hồi từ hợp phần môi trường tự nhiên của nó. Các hợp phần gây ô nhiễm của môi trường tự nhiên của nó là các nguyên liệu mà có thể cản trở chẩn đoán hoặc điều trị sử dụng đối với kháng thể, và có thể bao gồm enzym, hormon và các chất hoà tan protein hoặc không protein khác. Theo các phương án được ưu tiên, kháng thể sẽ được tinh chế (1) đến lớn hơn 95% khối lượng kháng thể như được xác định bởi phương pháp Lowry và tốt nhất là nhiều hơn 99% khối lượng, (2) đến mức đủ để thu được ít nhất là 15 gốc trình tự axit amin tận cùng N hoặc bên trong bằng cách sử dụng chất tạo trình tự cup quay, hoặc (3) đến đồng nhất bởi SDS-PAGE dưới các điều kiện khử hoặc không khử bằng cách sử dụng xanh Coomassie hoặc, tốt hơn là, nhuộm bạc. kháng thể được phân lập bao gồm kháng thể *in situ* trong tế bào tái tổ hợp do ít nhất là một hợp phần của môi trường tự nhiên của kháng thể sẽ không có mặt. Thông thường, tuy nhiên, kháng thể được phân lập sẽ được tạo ra bởi ít nhất là một bước tinh chế.

Đơn vị kháng thể chuỗi 4 bazơ là heterotetrame glycoprotein bao gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau (L) và hai chuỗi nặng giống nhau (H) (kháng thể IgM bao gồm 5 đơn vị heterotetrame bazơ cùng với polypeptit bổ sung được gọi là chuỗi J và nhờ đó chứa 10 vị trí gắn kết kháng nguyên, trong khi các kháng thể IgA được bài tiết có thể polyme hóa để tạo thành các bộ đa hóa trị bao gồm 2-5 đơn vị chuỗi 4 bazơ cùng với chuỗi J). Trong trường hợp về các IgG, đơn vị chuỗi 4 thường khoảng 150,000 dalton. Mỗi chuỗi L được liên kết với chuỗi H bằng một hoặc nhiều liên kết disulfua cùng hóa trị, trong khi hai chuỗi H được liên kết với nhau bởi một hoặc nhiều liên kết disulfua phụ thuộc vào chuỗi H isotyp. Mỗi chuỗi H và L cũng có các cầu disulfua trong chuỗi tạo khoảng trống điều hòa. Mỗi chuỗi H có ở tận cùng N, miền biến đổi (V_H) tiếp theo bởi ba miền cố định (C_H) đối mỗi chuỗi α và γ và bốn miền C_H đối với các μ và ε isotyp. Mỗi chuỗi L có ở tận cùng N, miền biến đổi (V_L) tiếp theo bởi miền cố định (C_L) ở đầu còn lại của nó. V_L được thắt với V_H và C_L được thắt với miền cố định thứ

nhất của chuỗi nặng (C_H1). Các gốc axit amin cụ thể được cho là tạo thành bề mặt chung giữa các miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Cặp đôi V_H và V_L cùng tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên đơn. Đối với cấu trúc và các đặc tính của các lớp kháng thể khác nhau, xem, ví dụ, Basic and Clinical Immunology, 8th edition, Daniel P. Stites, Abba I. Terr and Tristram G. Parslow (eds.), Appleton & Lange, Norwalk, CT, 1994, page 71 and Chapter 6.

Chuỗi L từ các loài động vật có xương sống có thể được phân loại thành một trong hai dạng khác nhau rõ ràng được gọi là kappa và lambda, dựa trên trình tự axit amin của các miền cố định của chúng. Phụ thuộc vào trình tự axit amin của miền cố định của chuỗi nặng của chúng (C_H), globulin miễn dịch có thể được chia thành các lớp hoặc isotyp khác nhau. Có năm lớp globulin miễn dịch: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, có các chuỗi nặng được ký hiệu là α, δ, ε, γ, và μ tương ứng. Các lớp γ và α còn được phân chia thành các phân lớp dựa trên sự khác nhau tương đối nhỏ trong trình tự và chức năng C_H, ví dụ, người biểu hiện các phân lớp sau đây: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA1, và IgA2.

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" của kháng thể đề cập đến các miền tận cùng amino của chuỗi nặng hoặc chuyển nhẹ của kháng thể. Miền biến đổi của chuỗi nặng có thể được gọi là "VH." Miền biến đổi của chuỗi nhẹ có thể được gọi là "VL." Các miền này thường là các phần biết đổi nhất của kháng thể và chứa các vị trí gắn kết kháng nguyên.

Thuật ngữ "biến đổi" đề cập đến thực tế rằng các mảnh của miền biến đổi khác nhau rõ ràng theo trình tự trong kháng thể. Miền V qua trung gian gắn kết nguyên và xác định cụ thể kháng thể đối với kháng nguyên cụ thể của nó. Tuy nhiên, tính đa dạng là không được phân bố qua cặp axit amin 110 của các miền biến đổi. Để thay thế, các vùng V bao gồm các kéo dài biến thể tương đối được gọi là các vùng khung (FR) của 15-30 axit amin được tách riêng rẽ bởi các vùng ngắn hơn rất đa dạng được gọi là "các vùng siêu biến" mà là dài 9-12 axit amin. Các miền biến đổi của các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ nguyên gốc bao gồm bốn FR, thích hợp hơn cấu hình β, được nối bởi ba vùng siêu biến, mà tạo thành các vòng nối và trong một số trường hợp tạo thành một phần của cấu trúc β. Các vùng siêu biến trong mỗi chuỗi được giữ cùng với nhau ở trạng thái gần nhau bởi FR và, với vùng siêu biến từ chuỗi khác, góp phần vào việc tạo thành vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể (xem Kabat et al., Sequences of

Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Các miền cố định không liên quan trực tiếp đến việc gắn kết kháng thể với kháng nguyên, nhưng thể hiện các chức năng phản ứng kích thích khác nhau, như tham gia vào kháng thể trong độc tố tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC).

Kháng thể "nguyên vẹn" là kháng thể mà bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên cũng như C_L và ít nhất là một các miền cố định chuỗi nặng, C_H1, C_H2 và C_H3. Các miền cố định có thể là các miền cố định trình tự nguyên gốc (*ví dụ* các miền cố định trình tự nguyên gốc của người) hoặc biến thể trình tự axit amin của chúng. Tốt hơn là, kháng thể nguyên vẹn có một hoặc nhiều chức năng phản ứng kích thích.

"Kháng thể trần" đối với mục đích ở đây là kháng thể mà không được liên hợp với phần độc tố hoặc chất đánh dấu miễn dịch.

"Mảnh kháng thể" bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn, tốt hơn là gắn kết kháng nguyên hoặc vùng biến đổi của kháng thể nguyên vẹn. Các ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm các mảnh Fab, Fab', $F(ab')_2$, và Fv; các diabody; các kháng thể tuyến tính (xem bằng Mỹ số 5,641,870, Example 2; Zapata et al., Protein Eng. 8(10): 1057-1062 [1995]); phân tử kháng thể chuỗi đơn; và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo thành từ mảnh kháng thể. Theo một phương án, mảnh kháng thể bao gồm vị trí gắn kết kháng nguyên của kháng thể nguyên vẹn và do đó vẫn có khả năng gắn kết kháng nguyên.

Tiêu hóa papain của kháng thể tạo ra hai mảnh gắn kết kháng nguyên giống nhau, được gọi là các mảnh "Fab" và mảnh "Fc" còn lại, ký hiệu đề cập đến khả năng tạo tinh thể dễ dàng. Mảnh Fab bao gồm toàn bộ chuỗi L cùng với miền của vùng biến đổi của chuỗi H (V_H), và miền cố định thứ nhất của một chuỗi nặng (C_H1). Mỗi mảnh Fab có hóa trị một với gắn kết kháng nguyên, nghĩa là, nó có vị trí gắn kết kháng nguyên đơn. Điều trị pepsin của kháng thể thu được mảnh lớn đơn $F(ab')_2$ mà tương ứng với hai mảnh Fab được liên kết disulfua có hoạt tính gắn kết kháng nguyên có hóa trị hai và vẫn có khả năng liên kết ngang kháng nguyên. Các mảnh Fab' khác với các mảnh Fab bằng cách có ít gốc bổ sung ở tận cùng carboxy của miền C_H1 bao gồm một hoặc nhiều xystein từ vùng khung kháng thể. Fab'-SH ký hiệu ở đây đối với Fab' trong đó (các) gốc xystein của các miền cố định mang nhóm thiol tự do. Mảnh kháng thể

$F(ab')_2$ ban đầu được tạo ra như các cặp của các mảnh Fab' mà có xystein khung giữa chúng. Các cặp đôi hóa học khác của mảnh kháng thể cũng đã được biết.

Mảnh Fc bao gồm các phần tận cùng carboxy của các chuỗi H giữ cùng với nhau bởi các disulfua. Các chức năng phản ứng kích thích của kháng thể được xác định bởi các trình tự trong vùng Fc, mà vùng này cũng được nhận biết một phần bởi các thụ thể Fc (FcR) được phát hiện trên một số kiểu tế bào.

"Fv" là mảnh kháng thể tối thiểu mà chứa vị trí nhận biết và gắn kết kháng nguyên hoàn toàn. Mảnh này bao gồm dime của một vùng miền chuỗi nặng và một chuỗi nhẹ theo kết hợp chặt chẽ, không cộng hóa trị. Trong các loài chuỗi đơn Fv (scFv), một miền biến đổi chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có thể được liên kết cộng hoá trị bởi cầu liên kết peptit linh hoạt sao cho các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng có thể kết hợp theo chất tương đồng cấu trúc "dime" với chất trong các loài Fv hai chuỗi. Từ nếp gấp của hai miền này phát ra sáu vòng siêu biến (3 vòng từ mỗi chuỗi H và L) mà góp phần vào các gốc axit amin để gắn kết kháng nguyên và tạo ra gắn kết kháng nguyên đặc hiệu với kháng thể. Tuy nhiên, thậm chí miền biến đổi đơn (hoặc một nửa Fv chỉ bao gồm ba CDR đặc hiệu đối với kháng nguyên) có khả năng nhận biết và gắn kết kháng nguyên, mặc dù ở ái lực thấp hơn toàn bộ vị trí gắn kết.

"Fv chuỗi đơn" cũng được viết tắt là "sFv" hoặc "scFv" là các mảnh kháng thể mà bao gồm các miền kháng thể V_H và V_L được nối với chuỗi polypeptit đơn. Tốt hơn là, sFv polypeptit còn bao gồm cầu liên kết polypeptit giữa các miền V_H và V_L mà làm cho sFv có khả năng tạo thành cấu trúc mong muốn để gắn kết kháng nguyên. Để xem xét sFv, xem Pluckthun in The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, vol. 113, Rosenburg và Moore eds., Springer-Verlag, New York, pp. 269-315 (1994); Borrebaeck 1995, infra.

Thuật ngữ "diabody" đề cập đến các mảnh kháng thể với hai vị trí gắn kết kháng nguyên, mà các mảnh này bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được nối với miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) trong chuỗi polypeptit giống nhau (VH-VL). Mảnh kháng thể nhỏ được tạo ra bằng cách tạo cấu trúc các mảnh sFv (xem đoạn trước đây) với các cầu liên kết ngắn (khoảng 5-10 gốc) giữa các miền V_H và V_L sao cho trong chuỗi nhưng không cặp đôi trong chuỗi các miền V là đạt được, dẫn đến mảnh có hóa trị hai, nghĩa là, mảnh có hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Các diabody có thể có hoá trị hai hoặc đặc hiệu kép. Các kháng thể đặc hiệu kép là các heterodime của hai mảnh sFv

"lai nhau" trong đó các miền V_H và V_L của hai kháng thể này có mặt trên các chuỗi polypeptit khác nhau. Các diabody được mô tả chi tiết hơn trong, ví dụ, EP 404,097; WO 93/11161; Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003); và Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:6444-6448 (1993). Các triabody và tetrabody cũng được mô tả trong Hudson et al., *Nat. Med.* 9:129-134 (2003).

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng ở đây đề cập đến kháng thể thu được từ quần thể kháng thể về căn bản là đồng nhất, nghĩa là, các kháng thể riêng rẽ bao gồm quần thể giống nhau ngoại trừ đối với các đột biến có thể xuất hiện trong tự nhiên có thể có mà có thể có mặt với lượng nhỏ. Các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu cao hơn, là trực tiếp đối với vị trí kháng nguyên đơn. Hơn nữa, trái với các chế phẩm kháng thể đa dòng mà bao gồm các kháng thể khác nhau trực tiếp đối với các quyết định (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng là trực tiếp đối với quyết định đơn trên kháng nguyên. Ngoài tính đặc hiệu của chúng, các kháng thể đơn dòng có thuận lợi trong đó chúng có thể được tổng hợp không gây ô nhiễm bởi kháng thể khác. Chất cải biến "đơn dòng" không được tạo cấu trúc cần thiết để sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng hữu ích theo sáng chế có thể được tạo ra bằng các phương pháp lai được mô tả lần đầu tiên bởi Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), hoặc có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp ADN tái tổ hợp ở vi khuẩn, động vật nhân điển hình hoặc tế bào thực vật (xem, ví dụ, bằng Mỹ số 4,816,567). "Các kháng thể đơn dòng" cũng có thể được phân lập từ thư viện kháng thể thể thực khuẩn bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) và Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991), chẳng hạn.

Các kháng thể đơn dòng ở đây bao gồm các kháng thể "khảm" trong đó phần chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ là giống với hoặc đồng nhất với các trình tự tương ứng ở kháng thể có nguồn gốc từ các loài cụ thể hoặc thuộc lớp hoặc phân lớp kháng thể cụ thể, trong khi phần còn lại của (các) chuỗi là giống với hoặc tương tự với trình tự tương ứng trong kháng thể có nguồn gốc từ các loài khác hoặc thuộc lớp hợp phân lớp kháng thể khác, cũng như các mảnh kháng thể này, miễn là chúng thể hiện hoạt tính sinh học mong muốn (xem bằng Mỹ số 4,816,567; và Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:6851-6855 (1984)). Các kháng thể khảm quan tâm ở đây bao gồm các kháng thể "động vật linh trưởng" bao gồm các trình tự gắn kết kháng nguyên miền

biến đổi có nguồn gốc từ các trình tự vùng cố định động vật linh trưởng không phải con người (ví dụ Old World Monkey, Ape etc), và trình tự vùng cố định con người.

Các dạng "được nhân hóa" của các kháng thể không phải của người (ví dụ, bộ gặm nhấm) là các kháng thể khảm mà chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người. Đối với hầu hết phần, các kháng thể được nhân hóa là các globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ vùng siêu biến người nhận được thay thế bởi các gốc từ vùng siêu biến của các loài không phải của người (kháng thể cho) như chuột đồng, chuột nhà hoặc động vật linh trưởng không phải người có tính đặc hiệu kháng thể, ái lực và khả năng mong muốn. Trong một số ví dụ, các gốc vùng khung (FR) của globulin miễn dịch của người được thay thế bởi các gốc tương ứng không phải của người. Hơn nữa, các kháng thể được nhân hóa có thể bao gồm các gốc mà không được phát hiện trong kháng thể nhận hoặc trong kháng thể cho. Các cải biến này được tạo thành để tinh chế tiếp kháng thể. Thông thường, kháng thể được làm thích hợp với người sẽ bao gồm về căn bản là tất cả của ít nhất là một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về căn bản là tất cả các vòng siêu biến tương ứng với các vòng của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc về căn bản là tất cả của FR là của trình tự globulin miễn dịch của người. kháng thể được làm thích hợp với người tuỳ ý cũng sẽ bao gồm ít nhất là một phần của vùng cố định của globulin miễn dịch (Fc), thường là của globulin miễn dịch của người. Để chi tiết hơn, xem Jones et al., Nature 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature 332:323-329 (1988); và Presta, Curr. Op. Struct. Biol. 2:593-596 (1992). Cũng xem các bài báo và tài liệu được trích dẫn ở đây: Vaswani and Hamilton, *Ann. Allergy, Asthma và Immunol.*, 1:105-115 (1998); Harris, *Biochem. Soc. Transactions*, 23:1035-1038 (1995); Hurle and Gross, *Curr. Op. Biotech.,* 5:428-433 (1994).

"Thio" khi được sử dụng ở đây đề cập đến kháng thể đề cập đến kháng thể được xử lý bởi xystein trong khi "hu" khi được sử dụng ở đây đề cập đến kháng thể đề cập đến kháng thể được làm thích hợp với người.

"Kháng thể của người" là kháng thể có trình tự axit amin tương ứng với trình tự của kháng thể được tạo ra bởi con người và/hoặc đã được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật bất kỳ để sản xuất kháng thể của người như được mô tả ở đây. Định nghĩa này về kháng thể của người đặc biệt ngoại trừ kháng thể được làm thích hợp với người bao gồm các gốc gắn kết kháng nguyên không phải của người. Các kháng thể của người có

thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các thư viện thể hiện thể thực khuẩn. Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227:381 (1991); Marks *et al.*, *J. Mol. Biol.*, 222:581 (1991). Cũng có giá trị để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người là các phương pháp được mô tả trong Cole *et al.*, *Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner *et al.*, *J. Immunol.*, 147(1):86-95 (1991). Cũng xem van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.*, 5: 368-74 (2001). Các kháng thể của người có thể được sản xuất bằng cách dùng kháng nguyên cho động vật chuyển gen mà đã được cải biến để tạo ra các kháng thể này đáp ứng với quyết định kháng nguyên, nhưng các vị trí nội sinh của chúng đã được làm bất hoạt, *ví dụ*, chuột được tạo miễn dịch (xem, *ví dụ*, các bằng Mỹ số 6,075,181 và 6,150,584 đề cập đến kỹ thuật XENOMOUSE™). Cũng xem, ví dụ, Li *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562 (2006) đề cập đến các kháng thể của người được tạo ra qua kỹ thuật lai tế bào B của người.

Thuật ngữ "vùng siêu biến", "HVR", hoặc "HV", khi được sử dụng ở đây đề cập đến các vùng của miền biến đổi kháng thể mà là siêu biến theo trình tự và/hoặc tạo thành các vòng được xác định về mặt cấu trúc. Thông thường, các kháng thể bao gồm sáu vùng siêu biến; ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3). Nhiều mô tả vùng siêu biến là trong sử dụng và được bao gồm ở đây. Các vùng quyết định phần bổ sung Kabat (CDR) được dựa trên tính biến đổi trình tự và được sử dụng phổ biến nhất (Kabat *et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991)). Chothia thay vì đề cập đến vị trí của các vòng cấu trúc (Chothia and Lesk *J. Mol. Biol.* 196:901-917 (1987)). Kết thúc vòng Chothia CDR-H1 khi được đánh số bằng cách sử dụng quy tắc đánh số Kabating thay đổi giữa H32 và H34 phụ thuộc vào chiều dài của vòng (điều này là bởi vì sơ đồ đánh số Kabating đặt các lồng ở H35A và H35B; nếu không có mặt 35A hoặc 35B, các đầu của vòng ở 32; nếu chỉ có mặt 35A, các đầu của vòng ở 33; nếu cả 35A và 35B cùng có mặt, các đầu của vòng ở 34). Các vùng siêu biến AbM thể hiện sự thỏa hiệp giữa Kabat CDR và các vòng cấu trúc Chothia và được sử dụng bởi phần mền điều biến kháng thể AbM của Oxford Molecular. Các vùng siêu biến "tiếp xúc" dựa trên sự phân tích của các cấu trúc tinh thể phức hợp hiện có. Các gốc từ mỗi vùng trong số các vùng siêu biến này là được nêu dưới đây.

Vòng	Kabat	AbM	Chothia	Tiếp xúc
L1	L24-L34	L24-L34	L24-L34	L30-L36
L2	L50-L56	L50-L56	L50-L56	L46-L55
L3	L89-L97	L89-L97	L89-L97	L89-L96
H1	H31-H35B	H26-H35B	H26-H32..34	H30-H35B
(Đánh số ố Kabating)				
H1	H31-H35	H26-H35	H26-H32	H30-H35
(Đánh số Chothia)				
H2	H50-H65	H50-H58	H52-H56	H47-H58
H3	H95-H102	H95-H102	H95-H102	H93-H101

Các vùng siêu biến có thể bao gồm "các vùng siêu biến kéo dài" như sau: 24-36 hoặc 24-34 (L1), 46-56 hoặc 50-56 (L2) và 89-97 (L3) trong VL và 26-35B (H1), 50-65, 47-65 hoặc 49-65 (H2) và 93-102, 94-102 hoặc 95-102 (H3) trong VH. Các gốc miền biến đổi được đánh số theo Kabat *et al.*, *nêu trên* đối với mỗi định nghĩa trong số các định nghĩa này.

Các gốc "khung" hoặc "FR" là các gốc miền biến đổi khác với các gốc vùng siêu biến được xác định ở đây.

Thuật ngữ "đánh số gốc miền biến đổi như trong Kabat" hoặc "đánh số vị trí axit amin như trong Kabat", và các biến thể của chúng, đề cập đến hệ đánh số được sử dụng đối với miền biến đổi chuỗi nặng hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD. (1991). bằng cách sử dụng hệ đánh số này, trình tự axit amin tuyến tính thực có thể chứa ít hoặc các axit amin bổ sung tuong ứng với việc làm ngắn hoặc hoặc chèn vào, FR hoặc CDR của miền biến đổi. Ví dụ, miền biến đổi chuỗi nặng có thể bao gồm lồng một axit amin (gốc 52a theo Kabat) sau gốc 52 của H2 và các gốc được chèn vào (ví dụ các gốc 82a, 82b, và 82c, v.v. theo Kabat) sau các gốc 82 của chuỗi nặng FR. Đánh số Kabat các gốc có thể được xác định đối với kháng thể đã nêu bằng cách sắp xếp ở các vùng tương động của trình tự của kháng thể với trình tự đánh số Kabat "tiêu chuẩn".

Hệ đánh số Kabat thường được sử dụng để cập đến gốc ở miền biến đổi (khoảng các gốc 1-107 của chuỗi nhẹ và các gốc 1-113 của chuỗi nặng) (ví dụ, Kabat *et al.*, *Sequences of Immunological Interest*. 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md. (1991)). "Hệ đánh số EU" hoặc "chỉ số EU" thường được sử dụng khi đề cập đến gốc trong vùng cố định chuỗi nặng globulin miễn dịch (ví dụ, chỉ số EU được thông báo trong Kabat *et al., nêu trên*). "Chỉ số EU theo Kabat" đề cập đến việc số gốc của kháng thể IgG1 EU của người. Trừ phi có quy định khác ở đây, tham khảo đến các số của gốc trong miền biến đổi của kháng thể có nghĩa là đánh số gốc theo hệ đánh số Kabat. Trừ phi có quy định khác ở đây, tham khảo đến các số gốc trong miền cố định của kháng thể có nghĩa là gốc đánh số theo hệ EU (ví dụ, xem đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 60/640,323, các Fig. để đánh số theo EU).

Kháng thể "trưởng thành ái lực" là kháng thể với một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều HVR của chúng mà dẫn đến cải thiện ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên, được so với kháng thể ban đầu mà không có (các) thay đổi này. Các kháng thể trưởng thành ái lực được ưu tiên sẽ có các ái lực nanomol hoặc thậm chí là picomol đối với kháng nguyên đích. Các kháng thể trưởng thành ái lực được tạo ra bởi các quy trình đã biết trong lĩnh vực này. Marks *et al. Bio/Technology* 10:779-783 (1992) mô tả sự trưởng thành ái lực bởi miền VH và VL. Các đột biến gen ngẫu nhiên của HVR và/hoặc các gốc khung được mô tả bởi: Barbas *et al. Proc Nat. Acad. Sci, USA* 91:3809-3813 (1994); Schier *et al. Gene* 169:147-155 (1995); Yelton *et al. J. Immunol.* 155:1994-2004 (1995); Jackson *et al., J. Immunol.* 154(7):3310-9 (1995); và Hawkins *et al, J. Mol. Biol.* 226:889-896 (1992).

Kháng thể "phong bế" hoặc kháng thể "chất đối kháng" là kháng thể mà ức chế hoặc làm giảm hoạt tính sinh học của kháng nguyên nó gắn kết. Các kháng thể phong bế hoặc kháng thể chất đối kháng được ưu tiên về căn bản là ức chế hoặc ức chế hoàn toàn hoạt tính sinh học của kháng nguyên.

"Kháng thể chất chủ vận" như được sử dụng ở đây là kháng thể mà mô phỏng ít nhất là một hoạt tính chức năng của polypeptit quan tâm.

"Kháng thể phụ thuộc loài," ví dụ, kháng thể của động vật có vú kháng IgE của người, là kháng thể mà có ái lực gắn kết mạnh đối với kháng nguyên từ các loài động vật có vú hơn là nó có ái lực gắn kết mạnh hơn đối với kháng nguyên từ các loài động vật có vú đầu tiên hơn là nó có tính đồng nhất của kháng nguyên từ loài động vật có vú

thứ hai. Thông thường, kháng thể phụ thuộc loài "gắn kết đặc hiệu" với kháng thể của người (nghĩa là, có giá trị ái lực gắn kết (Kd) không lớn hơn khoảng 1 x 10^{-7}M, tốt hơn là không lớn hơn khoảng 1 x 10^{-8} và tốt nhất là không lớn hơn khoảng 1 x 10^{-9} M) nhưng có ái lực gắn kết đối với thể tương đồng của kháng nguyên từ các loài động vật có vú không phải người thứ hai mà ít nhất là khoảng 50 lần, hoặc ít nhất là khoảng 500 lần, hoặc ít nhất là khoảng 1000 lần, yếu hơn ái lực gắn kết của nó đối với kháng nguyên của người. kháng thể phụ thuộc loài có thể là kháng thể thuộc các loại kháng thể khác nhau như được xác định trên đây, nhưng tốt hơn là kháng thể được nhân hóa hoặc của người.

"Ái lực gắn kết" thường đề cập đến cường độ của tổng tương tác không cộng hóa trị giữa vị trí gắn kết đơn của phân tử (ví dụ, kháng thể) và thành phần gắn kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ phi có quy định khác, như được sử dụng ở đây, "ái lực gắn kết" đề cập đến ái lực gắn kết nội tại mà đề cập đến sự tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với thành phần Y của nó thường có thể được thể hiện bởi hằng số phân ly (Kd). Ái lực có thể được xác định bởi các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các phương pháp được mô tả ở đây. Các kháng thể ái lực thấp thường gắn kết kháng nguyên chậm và có xu hướng phân ly nhanh chóng, trong khi các kháng thể có ái lực gắn kết cao thường gắn kết kháng nguyên nhanh hơn và có xu hướng duy trì gắn kết lâu hơn. Nhiều phương pháp xác định ái lực gắn kết là đã biết trong lĩnh vực này, phương pháp bất kỳ trong số chúng có thể được sử dụng cho các mục đích theo sáng chế. Các phương án đặc biệt nhằm minh họa sáng chế được mô tả sau đây.

"Hoặc tốt hơn" khi được sử dụng ở đây đề cập đến ái lực gắn kết đề cập đến sự gắn kết mạnh hơn giữa phân tử và thành viên gắn kết của nó. "Hoặc tốt hơn" khi được sử dụng ở đây đề cập đến gắn kết mạnh hơn, được thể hiện bởi giá trị số Kd nhỏ hơn. Ví dụ, kháng thể mà có ái lực đối với kháng nguyên là "6nM hoặc lớn hơn", ái lực của kháng thể này đối với kháng nguyên là <0,6nM, nghĩa là 0,59 nM, 0,58 nM, ,057nM v.v. hoặc giá trị bất kỳ nhỏ hơn 0,6nM.

Theo một phương án, "Kd" hoặc "giá trị Kd" theo sáng chế được xác định bằng thử nghiệm gắn kết kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ (RIA) được thực hiện với phiên bản Fab của kháng thể quan tâm và kháng nguyên của nó như được mô tả bởi thử nghiệm sau đây mà xác định ái lực gắn kết dung dịch của các Fab đối với kháng

nguyên bằng cách làm cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu của kháng nguyên được đánh dấu (^{125}I) với sự có mặt của nhiều độ chuẩn của kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó bắt kháng nguyên được đánh dấu với đĩa được bọc ngoài kháng thể kháng Fab (Chen, et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881). Để thiết lập các điều hiện đối với thử nghiệm này, các đĩa vi chuẩn (Dynex) được bọc ngoài qua đêm với 5µg/ml kháng thể kháng Fab bắt (Cappel Labs) trong 50mM natri carbonat (độ pH = 9,6), và sau đó được phong bế với 2% (khối lượng/thể tích) albumin huyết thanh bò trong PBS đối với từ hai đến năm giờ ở nhiệt độ trong phòng (khoảng 23°C). Trong đĩa không bám dính (Nunc #269620), 100 pM hoặc 26 pM [^{125}I] kháng nguyên được trộn với nhiều pha loãng Fab quan tâm (ví dụ, thích hợp với việc xác định kháng thể kháng VEGF, Fab-12, trong Presta et al., (1997) *Cancer Res.* 57:4593-4599). Fab quan tâm sau đó được ủ qua đêm; tuy nhiên, việc ủ có thể tiếp tục trong thời gian lâu hơn (ví dụ, 65 giờ) để đảm bảo rằng việc cân bằng là đạt được. Sau đó, hỗn hợp này được chuyển vào đĩa bắt để ủ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, trong một giờ). Sau đó, loại bỏ dung dịch và rửa đĩa này tám lần với 0,1% Tween-20 trong PBS. Khi các đĩa này được làm khô, 150µl/giếng nhấp nháy (MicroScint-20; Packard) được bổ sugn vào và đếm các đĩa này trên thiết bị đếm Topcount gama (Packard) trong mười phút. Các nồng độ của mỗi Fab mà thu được ít hơn hoặc bằng với 20% gắn kết tối đa là được chọn để sử dụng trong thử nghiệm gắn kết cạnh tranh. Theo phương án khác, Kd hoặc giá trị Kd được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng BIAcore^{TM}-2000 hoặc BIAcore^{TM}-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) ở 25°C với các chip kháng nguyên được làm bất động CM5 ở khoảng 10 đơn vị đáp ứng (RU). Một cách vắn tắt, các chip cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, BIAcore Inc.) được hoạt hóa với *N*-etyl-*N'*-(3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysucxinimit (NHS) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Kháng nguyên được pha loãng với 10mM natri axetat, độ pH = 4,8, trong 5ug/ml (khoảng 0,2uM) trước khi tiêm truyền ở tốc độ dòng là 5ul/phút đê đạt được khoảng 10 đơn vị đáp ứng (RU) của protein được cặp đôi. Sau khi tiêm truyền kháng nguyên, 1M etanolamin được tiêm vào để phong bế các nhóm không được phản ứng. Để xác định động học, các pha loãng gấp hai lần của Fab (từ 0,78 nM đến 500nM) được tiêm vào PBS với 0,05% Tween 20 (PBST) ở 25°C ở tốc độ dòng khoảng 25ul/phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được tính toán bằng cách sử

dụng mô hình gắn kết lần lượt Langmuir (BIAcore Evaluation Software version 3.2) bằng cách làm khớp đồng thời chương trình cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (Kd) được tính toán như là tỷ lệ k_{off}/k_{on}. Xem, ví dụ, Chen, Y., et al., (1999) *J. Mol Biol* 293:865-881. Nếu tốc độ kết hợp vượt quá 10^6 M^{-1} S^{-1} bởi thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt trên đây, sau đó tốc độ kết hợp có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật làm ngừng huỳnh quang mà xác định sự gia tăng hoặc giảm cường độ phát huỳnh quang (kích thích = 295 nm; phát ra = 340 nm, 16nm dải chuyển qua) ở 25°C của 20nM kháng thể kháng kháng nguyên (dạng Fab) trong PBS, độ pH = 7,2, với sự có mặt của nồng độ gia tăng của kháng nguyên như được xác định trong quang phổ kế, như quang phổ kế được lắp đặt dòng ngừng (Aviv Instruments) hoặc loạt 8000 quang phổ kế SLM-Aminco (ThermoSpectronic) kèm khuấy chậu thủy tinh màu đỏ.

"Tốc độ kết hợp" hoặc "k_{on}" theo sáng chế cũng có thể được xác định bằng kỹ thuật cộng hưởng plasmon bề mặt được mô tả trên đây bằng cách sử dụng BIAcore™-2000 hoặc BIAcore™-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) như được mô tả trên đây.

Cụm từ "về căn bản là tương tự," hoặc "về căn bản là giống nhau", như được sử dụng ở đây, xác định mức tương tự cao đáng kể giữa hai giá trị số (thường là được kết hợp với kháng thể theo sáng chế và còn lại kết hợp với kháng thể tham khảo/so sánh) sao cho chuyên gia trong lĩnh vực này có thể xem xét sự khác nhau giữa hai giá trị sẽ là ít hoặc không có ý nghĩa sinh học và/hoặc thống kê trong tính đặc trưng sinh học được xác định bởi giá trị này (ví dụ, giá trị Kd). Sự khác nhau giữa hai giá trị này tốt hơn là ít hơn khoảng 50%, tốt hơn là ít hơn khoảng 40%, tốt hơn là ít hơn khoảng 30%, tốt hơn là ít hơn khoảng 20%, tốt hơn là ít hơn khoảng 10% như chức năng giá trị đối với kháng thể tham khảo/so sánh.

Cụm từ "về căn bản là giảm" hoặc "về căn bản là khác nhau", như được sử dụng ở đây, xác định mức khác nhau đáng kể giữa hai giá trị số (thường là một kết hợp với kháng thể theo sáng chế và một kết hợp với kháng thể tham khảo/so sánh) sao cho chuyên gia trong lĩnh vực này có thể xem xét sự khác nhau giữa hai giá trị có ý nghĩa thống kê theo tính đặc trưng sinh học được xác định bởi giá trị này (ví dụ, giá trị Kd, đáp ứng HAMA). Sự khác nhau giữa hai giá trị số tốt hơn là lớn hơn khoảng 10%, tốt hơn là lớn hơn khoảng 20%, tốt hơn là lớn hơn khoảng 30%, tốt hơn là lớn hơn khoảng

40%, tốt hơn là lớn hơn khoảng 50% như chức năng giá trị đối với kháng thể tham khảo/so sánh.

"Kháng nguyên" là kháng nguyên được xác định trước mà kháng thể có thể gắn kết chọn lọc. Kháng nguyên đích có thể là polypeptit, carbohydrat, axit nucleic, lipit, hapten hoặc hợp chất xuất hiện tự nhiên hoặc tổng hợp khác. Tốt hơn là, kháng nguyên đích là polypeptit.

"Khung nhận của người" đối với mục đích ở đây là khung bao gồm trình tự axit amin của khung VL hoặc VH có nguồn gốc từ khung globulin miễn dịch của hoặc từ khung liên ứng của người. Khung nhận của người "có nguồn gốc từ" khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể bao gồm trình tự axit amin của chúng hoặc có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin đang tồn tại trước. Khi trình tự axit amin đang tồn tại trước có mặt, tốt hơn là không nhiều hơn 5 và tốt hơn là 4 hoặc ít hơn hoặc 3 hoặc ít hơn, thay đổi trình tự axit amin đang tồn tại trước có mặt. Khi các thay đổi axit amin đang tồn tại trước có mặt trong VH, tốt hơn là các thay đổi này chỉ ở ba, hai hoặc một vị trí 71H, 73H và 78H; ví dụ, các gốc axit amin ở các vị trí này có thể là 71A, 73T và/hoặc 78A. Theo một phương án, khung nhận của người VL giống nhau trong trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch VL của người hoặc trình tự khung liên ứng của người.

"Khung liên ứng của người" là khung mà thể hiện gốc axit amin xuất hiện phổ biến nhất theo sự chọn lọc các trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người. Thông thường, việc chọn lọc các trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch của người từ phân nhóm trình tự miền biến đổi. Thông thường, phân nhóm trình tự là phân nhóm như trong Kabat *et al.* Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như trong Kabat *et al.* Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như trong Kabat *et al.*

"Khung liên ứng phân nhóm III VH" bao gồm trình tự liên ứng thu được từ trình tự axit amin trong phân nhóm III biến đổi chuỗi nặng của Kabat *et al.* Theo một phương án, trình tự axit amin khung liên ứng phân nhóm III VH bao gồm ít nhất là một phần hoặc tất cả các trình tự sau đây: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143)-H1-WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144)-H2-RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 145)-H3-WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

"Khung liên ứng phân nhóm I VL" bao gồm trình tự liên ứng thu được từ trình tự axit amin trong phân nhóm I kappa chuỗi nhẹ biến đổi của Kabat *et al.* Theo một phương án, trình tự axit amin khung liên ứng phân nhóm I VL bao gồm ít nhất là một phần hoặc tất cả trình tự sau đây:
DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 139)-L1-WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 140)-L2-GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 141)-L3-FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 142).

"Khung không được cải biến của người" là khung của người mà có trình tự axit amin giống như khung nhận của người, *ví dụ* thiếu (các) thay thế axit amin không phải của người trong khung nhận của người.

"Vùng siêu biến được thay đổi" đối với mục đích ở đây là vùng siêu biến bao gồm một hoặc nhiều (*ví dụ* từ một đến khoảng 16) thay thế axit amin trong đó.

"Vùng siêu biến không được cải biến" cho mục đích ở đây là vùng siêu biến có trình tự axit amin giống với kháng thể không phải của người từ đó nó được tạo ra, *nghĩa là* vùng mà thiếu một hoặc nhiều thay thế axit amin trong đó.

Kháng thể "mà gắn kết" kháng nguyên quan tâm, ví dụ đích kháng nguyên polypeptit liên quan đến khối u là kháng thể mà gắn kết kháng nguyên với ái lực đủ sao cho kháng thể là hữu ích làm chất điều trị trong việc tạo đích tế bào hoặc mô biểu hiện kháng nguyên và không phản ứng ngang đáng kể với protein khác. Theo phương án này, mức độ gắn kết của kháng thể với protein "không đích" sẽ ít hơn khoảng 10% gắn kết kháng thể với protein đích cụ thể của nó như được xác định bởi phân tích sắp xếp tế bào được haotj hóa huỳnh quang (FACS) kết tủa miễn dịch phóng xạ (RIA). Liên quan đến sự gắn kết của kháng thể với phân tử đích, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết đặc hiệu với" hoặc là "đặc hiệu với" polypeptit cụ thể hoặc epitop trên đích polypeptit cụ thể có nghĩa là gắn kết mà có thể xác định khác với sự tương tác không đặc hiệu. Gắn kết đặc hiệu có thể được xác định, ví dụ, bằng cách xác định sự gắn kết của phân tử được so với gắn kết của phân tử đối chứng, mà thường là phân tử có cấu trúc tương tự mà không có hoạt tính gắn kết. Ví dụ, gắn kết đặc hiệu có thể được xác định bằng cách cạnh tranh với phân tử đối chứng mà tương tự với đích, ví dụ, lượng dư đích không được đánh dấu. Trong trường hợp này, gắn kết đặc hiệu được chỉ định nếu việc gắn kết của đích được đánh dấu với đầu dò được ức chế hoàn toàn bằng lượng dư đích không được đánh dấu. Thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" hoặc "gắn kết đặc

hiệu với" hoặc là "đặc hiệu với" polypeptit cụ thể hoặc epitop trên đích polypeptit cụ thể như được sử dụng ở đây có thể được thể hiện, ví dụ, bởi phân tử có Kd đối với đích ít hơn khoảng 10^{-4} M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-5} M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-6} M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-7} M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-8} M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-9} M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-10} M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-11}M, theo cách khác ít nhất là khoảng 10^{-12} M, hoặc lớn hơn. Theo một phương án, thuật ngữ "gắn kết đặc hiệu" đề cập đến việc gắn kết trong đó phân tử gắn kết với polypeptit cụ thể hoặc epitop trên polypeptit cụ thể về căn bản là không gắn kết với polypeptit khác bất kỳ hoặc polypeptit epitop.

Kháng thể mà "ức chế sự phát triển của tế bào biểu hiện CD79b polypeptit" hoặc kháng thể "ức chế sự phát triển" là kháng thể mà dẫn đến sự ức chế phát triển có thể xác định tế bào ung thư biểu hiện hoặc biểu hiện quá mức CD79b polypeptit thích hợp. CD79b polypeptit có thể là polypeptit chuyển màng được biểu hiện trên bề mặt của tế bào ung thư hoặc có thể là polypeptit mà được tạo ra và được tiết bởi tế bào ung thư. kháng thể kháng CD79b ức chế sự phát triển được ưu tiên ức chế sự phát triển của tế bào khối u biểu hiện CD79b lớn hơn 20%, tốt hơn là khoảng từ 20% đến 50%, và thậm chí tốt hơn nữa là, lớn hơn 50% (ví dụ, khoảng từ 50% đến 100%) như được so với đối chứng thích hợp, đối chứng thường là tế bào khối u không được xử lý với kháng thể sẽ được thử nghiệm. Theo một phương án, sự ức chế phát triển có thể được xác định ở nồng độ kháng thể khoảng từ 0,1 đến 30 μg/ml hoặc khoảng từ 0,5nM đến 200 nM trong môi trường nuôi cấy tế bào, trong đó sự ức chế phát triển được xác định 1-10 ngày sau khi cho tế bào khối u tiếp xúc với kháng thể. Ức chế phát triển tế bào khối u in vivo có thể được xác định theo nhiều cách khác nhau như được mô tả trong phần Ví dụ thử nghiệm dưới đây. kháng thể ức chế phát triển in vivo nếu việc dùng kháng thể kháng CD79b ở khoảng từ 1μg/kg đến 100 mg/kg thể trọng dẫn đến giảm kích thước khối u hoặc tăng sinh tế bào khối u trong khoảng từ 5 ngày đến 3 tháng từ lần dùng kháng thể thứ nhất, tốt hơn là khoảng từ 5 đến 30 ngày.

Kháng thể mà "gây chết tế bào" là kháng thể mà gây chết tế bào được lập trình trước như được xác định bởi sự gắn kết của annexin V, mảnh ADN, phần co tế bào, giãn mạng lưới nội chất, phân đoạn tế bào và/hoặc tạo thành túi màng (được gọi là các thể giết chết tế bào). Tế bào thường là tế bào mà biểu hiện quá mức CD79b polypeptit.

Tốt hơn là, tế bào là tế bào khối u, ví dụ, tế bào tạo huyết, như tế bào B, tế bào T, ưa bazơ, ưa eozin, ưa nhân, đơn nhân, tiểu huyết cầu hoặc hồng cầu. Các phương pháp khác nhau là hiện có để đánh giá các sự kiện tế bào kết hợp với giết chết tế bào. Ví dụ, sự hoán vị phosphatidyl serin (PS) có thể được xác định bằng gắn kết anexin; mảnh ADN có thể được đánh giá thông qua thang ADN; và cô đặc nhân/nhiễm sắc thể cùng với tạo mảnh ADN có thể được đánh giá bằng cách gia tăng bất kỳ các tế bào hypodiploit. Tốt hơn là, kháng thể mà gây chết tế bào là kháng thể mà dẫn đến khoảng từ 2 đến 50 lần, tốt hơn là khoảng từ 5 đến 50 lần và tốt nhất là khoảng từ 10 đến 50 lần, cảm biến gắn kết anexin so với tế bào không được xử lý trong thử nghiệm gắn kết anexin.

Kháng thể "gây chết tế bào" là kháng thể mà làm cho tế bào có thể sống trở thành không thể sống. Tế bào là tế bào mà biểu hiện CD79b polypeptit và là kiểu tế bào mà biểu hiện đáng kể hoặc biểu hiện quá mức CD79b polypeptit. Tế bào có thể là tế bào ung thư hoặc tế bào bình thường thuộc loại tế bào cụ thể. CD79b polypeptit có thể là polypeptit chuyển màng được biểu hiện trên bề mặt của tế bào ung thư hoặc có thể là polypeptit được tạo ra và được sàng lọc bởi tế bào ung thư. Tế bào có thể là tế bào ung thư, ví dụ, tế bào B hoặc tế bào T. Chết tế bào *in vitro* có thể được xác định với sự không có mặt của phần bổ sung và tế bào phản ứng kích thích miễn dịch để phân biệt với gây chết tế bào gây ra bởi độc tố tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) hoặc độc tố tế bào phụ thuộc phần bổ sung (CDC). Do đó, thử nghiệm chết tế bào có thể được thực hiện bằng cách sử dụng huyết thanh được làm bất hoạt nhiệt độ (nghĩa là, với sự không có mặt của phần bổ sung) và không có mặt của tế bào phản ứng kích thích miễn dịch. Để xác định liệu rằng kháng thể có khả năng gâyt chết tế bào, mất tính nguyên vẹn của màng như được xác định bằng cách hấp thu propidi iodua (PI), xanh trypan (xem Moore et al. Cytotechnology 17:1-11 (1995)) hoặc 7AAD có thể được đánh giá so với tế bào không được xử lý. kháng thể gây chết tế bào được ưu tiên là kháng thể mà gây hấp thu PI trong thử nghiệm hấp thu PI ở các tế bào BT474.

"Chức năng phản ứng kích thích" của kháng thể đề cập đến các hoạt tính sinh học góp phần vào vùng Fc (vùng Fc trình tự nguyên gốc hoặc biến thể trình tự axit amin vùng Fc) của kháng thể, và thay đổi với kháng thể isotyp. Các ví dụ về chức năng phản ứng kích thích của kháng thể bao gồm: gắn kết C1q độc tố tế bào phụ thuộc

phần bổ sung; gắn kết thụ thể Fc; độc tố tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC); sự thực bào; điều chỉnh giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và hoạt hóa tế bào B.

Thuật ngữ "vùng Fc" ở đây được sử dụng để xác định vùng tận cùng C của chuỗi nặng globulin miễn dịch, bao gồm các vùng Fc trình tự nguyên gốc và các vùng Fc biến thể. Mặc dù các giới hạn của vùng Fc của chuỗi nặng globulin miễn dịch có thể thay đổi, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người thường được xác định để kéo dài từ gốc axit amin ở vị trí Cys226, hoặc từ Pro230, đến tận cùng carboxyl của chúng. Lysin tận cùng C (gốc 447 theo hệ đánh số theo EU) của vùng Fc có thể được loại bỏ, ví dụ, trong thời gian sản xuất hoặc tinh chế kháng thể hoặc bằng cách sản xuất tái tổ hợp axit nucleic mã hoá chuỗi nặng của kháng thể. Do đó, chế phẩm chứa kháng thể nguyên vẹn có thể bao gồm quần thể kháng thể với tất cả các gốc K447 được loại bỏ, quần thể kháng thể với không có các gốc K447 được loại bỏ và quần thể kháng thể có hỗn hợp kháng thể có và không có gốc K447.

"Vùng Fc chức năng" có "chức năng phản ứng kích thích" của vùng Fc trình tự nguyên gốc. "Chức năng phản ứng kích thích" ví dụ bao gồm gắn kết C1q; CDC; gắn kết thụ thể Fc; ADCC; thực bào; điều chỉnh giảm thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B; BCR), v.v.. Các chức năng phản ứng kích thích thường cần vùng Fc sẽ được kết hợp với miền gắn kết (*ví dụ*, miền biến đổi kháng thể) và có thể được thử nghiệm bằng cách sử dụng các thử nghiệm khác nhau như được bộc lộ, ví dụ, trong các định nghĩa ở đây.

"Vùng Fc trình tự nguyên gốc" bao gồm trình tự axit amin giống với trình tự axit amin của vùng Fc được tìm thấy trong tự nhiên. Các vùng Fc của người trình tự nguyên gốc bao gồm vùng Fc IgG1 trình tự nguyên gốc của người (không phải kiểu A và kiểu A); vùng Fc IgG2 trình tự nguyên gốc của người; vùng Fc IgG3 trình tự nguyên gốc của người; và vùng Fc IgG4 trình tự nguyên gốc của người cũng như các biến thể xuất hiện tự nhiên của chúng.

"Vùng Fc biến thể" bao gồm trình tự axit amin mà khác với trình tự của vùng Fc trình tự nguyên gốc bởi ít nhất là một cải biến axit amin, tốt hơn là một hoặc nhiều thay thế axit amin. Tốt hơn là, vùng Fc biến thể có ít nhất là một thay thế axit amin được so với vùng Fc trình tự nguyên gốc hoặc với vùng Fc của polypeptit ban đầu, ví dụ khoảng từ một đến mười thay thế axit amin và tốt hơn là khoảng từ một đến năm

thay thế axit amin trong vùng Fc trình tự nguyên gốc hoặc vùng Fc của polypeptit ban đầu. Vùng Fc biến thể ở đây sẽ tốt hơn là có ít nhất là khoảng 80% tương đồng với vùng Fc trình tự nguyên gốc và/hoặc với vùng Fc của polypeptit ban đầu và tốt nhất là ít nhất là khoảng 90% tương đồng với nó, tốt hơn nữa là ít nhất là khoảng 95% tương đồng với nó.

"Độc tố tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể" hoặc "ADCC" đề cập đến dạng độc tố tế bào trong đó Ig được tiết gắn kết trên các thụ thể Fc (các FcR) có mặt trên một số tế bào độc tố (ví dụ, các tế bào Natural Killer (NK), ưa nhân và đại thực bào) có khả năng làm cho các tế bào phản ứng kích thích độc tố này gắn kết đặc hiệu với tế bào đích mang kháng nguyên và về căn bản là giết chết tế bào đích với các độc tố tế bào. Các kháng thể "mục tiêu" tế bào độc tố và là cần thiết để giết chết tế bào này. Các tế bào nguyên thủy qua trung gian ADCC, các tế bào NK, chỉ biểu hiện FcγRIII, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện của FcR trên các tế bào tạo huyết được tổng kết trong Bảng 3 trên trang 464 của Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm, thử nghiệm *in vitro* ADCC, như thử nghiệm được mô tả trong bằng Mỹ số 5,500,362 hoặc 5,821,337 có thể được thực hiện. Các tế bào phản ứng kích thích hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm các tế bào đơn nhân của máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào Natural Killer (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm có thể được đánh giá in vivo, ví dụ, trong mô hình động vật như được mô tả trong Clynes et al.Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 95:652-656 (1998).

"Thụ thể Fc" hoặc "FcR" mô tả thụ thể gắn kết với vùng Fc của kháng thể. FcR được ưu tiên là FcR trình tự nguyên gốc của người. Hơn nữa, FcR được ưu tiên gắn kết kháng thể IgG (thụ thể gama) và bao gồm các thụ thể của phân lớp FcγRI, FcγRII và FcγRIII, bao gồm các biến thể alen và theo cách khác các dạng ghép của các thụ thể này. Các thụ thể FcγRII bao gồm FcγRIIA ("thụ thể hoạt hóa") và FcγRIIB ("thụ thể ức chế"), mà có các trình tự axit amin giống nhau mà khác nhau cơ bản trong các miền tế bào chất của chúng. Thụ thể FcγRIIA hoạt hóa chứa motif hoạt hóa dựa trên thụ thể miễn dịch (ITAM) trong miền tế bào chất của nó. Thụ thể ức chế FcγRIIB chứa motif ức chế dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch (ITIM) trong miền tế bào chất của nó. (xem M. in Daëron, Annu. Rev. Immunol. 15:203-234 (1997)). FcRs được xem xét trong

Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-492 (1991); Capel et al., Immunomethods 4:25-34 (1994); và de Haas et al., J. Lab. Clin. Med. 126:330-41 (1995). Các FcR khác, bao gồm sẽ được xác định trong tương lai, được bao gồm bởi thuật ngữ "FcR" ở đây. Thuật ngữ này cũng bao gồm thụ thể neonatal, FcRn, mà có khả năng đáp ứng để chuyển IgG thể mẹ vào bào thai (Guyer et al., J. Immunol. 117:587 (1976) và Kim et al., J. Immunol. 24:249 (1994)).

Gắn kết với FcRn in vivo của người và chu kỳ nửa phân rã huyết thanh của polypeptit gắn kết ái lực cao FcRn của người có thể được thử nghiệm, *ví dụ*, ở các dòng tế bào chuột chuyển gen hoặc tế bào được chuyển nhiễm của người biểu hiện FcRn của người hoặc ở động vật linh trưởng mà các polypeptit với vùng Fc biến thể được dùng. WO 2000/42072 (Presta) mô tả các biến thể kháng thể với sự gắn kết với FcR được cải thiện hoặc giảm. Cũng xem, *ví dụ*, Shields *et al. J. Biol. Chem.* 9(2):6591-6604 (2001).

"Các tế bào phản ứng kích thích của người" là tế bào bạch cầu mà biểu hiện một hoặc nhiều FcR và thực hiện chức năng phản ứng kích thích. Tốt hơn là, tế bào biểu hiện ít nhất là một FcγRIII và thực hiện chức năng phản ứng kích thích ADCC. Các ví dụ về bạch cầu của người mà qua trung gian ADCC bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC), tế bào giết chết tự nhiên (NK), bạch cầu đơn nhân, tế bào T độc tố tế bào và ưa nhân; với các tế bào PBMC và NK là được ưu tiên. Các tế bào phản ứng kích thích có thể đợc phân lập từ nguồn nguyên gốc, ví dụ, từ máu.

"Độc tố tế bào phụ thuộc phần bổ sung" hoặc "CDC" đề cập đến việc làm tan tế bào đích với sự có mặt của phần bổ sung. Sự hoạt hóa con đường bổ sung cổ điển được khởi nguồn bằng cách gắn kết của phần bổ sung thứ nhất của hệ bổ sung (C1q) với các kháng thể (của phân lớp thích hợp) mà được gắn kết với kháng nguyên cùng nguồn gốc của chúng. Để đánh giá sự hoạt hóa phần bổ sung, thử nghiệm CDC, ví dụ, như được mô tả trong Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202:163 (1996), có thể được thực hiện. Các biến thể polypeptit với trình tự axit amin vùng Fc thay đổi (các polypeptit với vùng Fc biến thể) và khả năng gắn kết C1q gia tăng hoặc giảm được mô tả, *ví dụ*, trong các bằng Mỹ số 6,194,551 B1 và WO 1999/51642. Cũng xem, *ví dụ*, Idusogie *et al. J. Immunol.* 164: 4178-4184 (2000).

Thuật ngữ "kháng thể bao gồm vùng Fc" đề cập đến kháng thể mà bao gồm vùng Fc. Lysin tận cùng C (gốc 447 theo hệ đánh số EU) của vùng Fc có thể được loại

bỏ, ví dụ, trong thời gian tinh chế kháng thể hoặc bằng kỹ thuật tái tổ hợp của kháng thể mã hoá axit amin. Do đó, chế phẩm bao gồm kháng thể có vùng Fc theo sáng chế có thể bao gồm kháng thể với K447, với tất cả K447 được loại bỏ hoặc hỗn hợp gồm kháng thể có và không có gốc K447.

CD79b polypeptit "miền ngoại bào" hoặc "ECD" đề cập đến dạng CD79b polypeptit mà về căn bản là không có miền chuyển màng và tế bào chất. Thông thường, CD79b polypeptit ECD sẽ có ít hơn 1% miền chuyển màng và/hoặc tế bào chất và tốt hơn là sẽ có ít hơn 0,5% miền này. Sẽ được hiểu rằng các miền chuyển màng bất kỳ được nhận biết đối với CD79b polypeptit theo sáng chế được nhận biết theo các tiêu chuẩn thường được dùng trong lĩnh vực này để nhận biết liều miền kỵ nước. Các giới hạn đúng của miền chuyển màng có thể thay đổi nhưng có khả năng nhất là không nhiều hơn khoảng 5 axit amin ở đầu của miền này như được xác định ban đầu ở đây. Tuỳ ý, do đó, miền ngoại bào của CD79b polypeptit có thể chứa khoảng từ 5 axit amin hoặc ít hơn trên cạnh của miền chuyển màng/giới hạn miền ngoại bào như được xác định trong các Ví dụ hoặc phần mô tả và các polypeptit này có hoặc không có peptit tín hiệu liên quan và axit nucleic mã hoá chúng được bao gồm theo sáng chế.

Vị trí thích hợp của "peptit tín hiệu" của CD79b polypeptit được mô tả ở đây có thể được thể hiện theo sáng chế và/hoặc các Fig. kèm theo. Tuy nhiên, được lưu ý rằng giới hạn tận cùng C của peptit tín hiệu có thể thay đổi, nhưng có thể nhất là không nhiều hơn khoảng 5 axit amin trên cạnh của giới hạn tận cùng C peptit tín hiệu như được xác định ban đầu ở đây, trong đó giới hạn tận cùng C của peptit tín hiệu có thể được nhận biết theo các tiêu chuẩn thường được dùng trong lĩnh vực này để nhận biết dạng của yếu tố trình tự axit amin (ví dụ, Ninelso et al., Prot. Eng. 10:1-6 (1997) và von Heinje et al., Nucl. Acids. Res. 14:4683-4690 (1986)). Ngoài ra, cũng được nhận biết rằng, trong một số trường hợp, việc phân tách trình tự tín hiệu từ polypeptit được tiết là không hoàn toàn đồng nhất, dẫn đến không nhiều hơn một loài được tiết. Các polypeptit trưởng thành này, nếu peptit tín hiệu được tách trong không nhiều hơn khoảng 5 axit amin trên cạnh của giới hạn tận cùng C của peptit tín hiệu như được xác định ở đây và polynucleotit mã háo chúng, được bao gồm theo sáng chế.

"Biến thể CD79b polypeptit" có nghĩa là CD79b polypeptit, tốt hơn là CD79b polypeptit hoạt hoá, như được xác định ở đây có ít nhất là khoảng 80% trình tự axit amin tương đồng với toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit trình tự nguyên gốc

như được mô tả ở đây, trình tự CD79b polypeptit thiếu peptit tín hiệu như được mô tả ở đây, miền ngoại bào của CD79b polypeptit có hoặc không có peptit tín hiệu, như được mô tả ở đây hoặc mảnh khác bất kỳ của toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit như được mô tả ở đây (như được mã hoá bởi axit nucleic mà chỉ thể hiện một phần trình tự mã hoá hoàn toàn đối với toàn bộ chiều dài CD79b polypeptit). Các biến thể CD79b polypeptit, ví dụ, CD79b polypeptit trong đó một hoặc nhiều gốc axit amin được thêm hoặc loại bỏ ở tận cùng N hoặc C của toàn bộ chiều dài trình tự axit amin. Thông thường, biến thể CD79b polypeptit sẽ có ít nhất là khoảng 80% trình tự axit amin tương đồng, theo cách khác ít nhất là khoảng 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự axit amin tương đồng, với toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit trình tự nguyên gốc như được mô tả ở đây, trình tự CD79b polypeptit thiếu peptit tín hiệu như được mô tả ở đây, miền ngoại bào của CD79b polypeptit có hoặc không có peptit tín hiệu, như được mô tả ở đây hoặc mảnh được xác định cụ thể khác bất kỳ của toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit như được mô tả ở đây. Thông thường, biến thể CD79b polypeptit có ít hơn khoảng 10 axit amin theo chiều dài, theo cách khác ít nhất là khoảng 20, 30, 40, 50, 60, 70, 80, 90, 100, 110, 120, 130, 140, 150, 160, 170, 180, 190, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600 axit amin theo chiều dài hoặc nhiều hơn. Thông thường, biến thể CD79b polypeptit sẽ không có nhiều hơn một thay thế axit amin bảo tồn như được so với trình tự CD79b polypeptit nguyên gốc, theo cách khác, không nhiều hơn 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10 thay thế axit amin bảo tồn như được so với trình tự CD79b polypeptit nguyên gốc.

"Phần trăm (%) trình tự axit amin tương đồng" với trình tự peptit hoặc polypeptit được xác định ở đây là được xác định như phần trăm các gốc axit amin trong trình tự quan tâm mà giống với các gốc axit amin trong trình tự peptit hoặc polypeptit cụ thể, nghĩa là CD79b polypeptit, sau khi sắp xếp trình tự và đưa vào các kẽ hở, nếu cần, để đạt được phần trăm tương đồng tối đa về trình tự và không xét đến các thay thế bảo tồn bất kỳ như là một phần của trình tự tương đồng. Sắp xếp nhằm mục đích xác định phần trăm trình tự axit amin tương đồng có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau mà đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm

máy tính hiện có rộng rãi như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Các chuyên gia trong lĩnh vực này có thể xác định các tham biến thích hợp để xác định sự sắp xếp, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được sắp xếp tối đa qua toàn bộ chiều dài của trình tự sẽ được so sánh. Đối với mục đích ở đây, tuy nhiên, giá trị % trình tự axit amin tương đồng được sinh ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2, trong đó mã nguồn đầy đủ cho chương trình ALIGN-2 được nêu trong Bảng 1 dưới đây. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc. và mã nguồn được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây đã được nộp với tài liệu của người sử dụng ở U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, trong đó nó được đăng ký dưới U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Chương trình ALIGN-2 hiện có rộng rãi qua Genentech, Inc., South San Francisco, California hoặc có thể biên dịch từ mã nguồn được nêu trong Bảng 1 dưới đây. Chương trình ALIGN-2 sẽ được biên dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, tốt hơn là UNIX V4.0D số. Tất cả các tham biến so sánh trình tự được đặt bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong các trình huống trong đó ALIGN-2 được dùng để so sánh trình tự axit amin, % trình tự axit amin tương đồng của trình tự axit amin A đã nêu với, hoặc đối với trình tự axit amin B đã nêu (mà theo cách khác có thể tạo pha như trình tự axit amin A đã nêu mà có hoặc bao gồm một số % trình tự axit amin tương đồng với, hoặc đối với trình tự axit amin B) đã nêu là được tinh toán như sau:

100 lần phân số X/Y

trong đó X là số lượng gốc axit amin được ghi điểm như là thích hợp tương đồng bởi chương trình sắp xếp trình tự ALIGN-2 trong đó sự sắp xếp chương trình của A và B, và trong đó Y là tổng số gốc axit amin trong B. Sẽ thích hợp rằng nếu chiều dài trình tự axit amin A là không bằng với chiều dài của trình tự axit amin B, % trình tự axit amin tương đồng của A với B sẽ không bằng với % trình tự axit amin tương đồng của B với A.

"Biến thể CD79b polynucleotit" hoặc “biến thể trình tự axit nucleic CD79b” có nghĩa là phân tử axit nucleic mà mã hoá CD79b polypeptit, tốt hơn là CD79b polypeptit hoạt tính, như được xác định ở đây và có ít nhất là khoảng 80% trình tự axit nucleic tương đồng với trình tự axit nucleotit mã hoá toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit trình tự nguyên gốc như được mô tả ở đây, toàn bộ chiều dài trình tự CD79b

polypeptit trình tự nguyên gốc thiếu peptit tín hiệu như được mô tả ở đây, miền ngoại bào của CD79b polypeptit, có hoặc không có peptit tín hiệu, như được mô tả ở đây hoặc mảnh khác bất kỳ của toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit như được mô tả ở đây (như được mã hoá bởi axit nucleic mà thể hiện chỉ một phần trình tự mã hoá hoàn toàn đối với toàn bộ chiều dài CD79b polypeptit). Thông thường, biến thể CD79b polynucleotit sẽ có ít nhất là khoảng 80% trình tự axit nucleic tương đồng, theo cách khác ít nhất là khoảng 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% trình tự axit nucleic tương đồng với trình tự axit nucleic mã hoá toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit trình tự nguyên gốc như được mô tả ở đây, toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit trình tự nguyên gốc thiếu peptit tín hiệu như được mô tả ở đây, miền ngoại bào của CD79b polypeptit, có hoặc không có trình tự tín hiệu, như được mô tả ở đây hoặc mảnh khác bất kỳ của toàn bộ chiều dài trình tự CD79b polypeptit như được mô tả ở đây. Các biến thể không bao gồm trình tự nucleotit nguyên gốc.

Thông thường, biến thể CD79b polynucleotit có ít nhất khoảng 5 nucleotit theo trình tự, theo cách khác ít nhất là khoảng 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, 35, 40, 45, 50, 55, 60, 65, 70, 75, 80, 85, 90, 95, 100, 105, 110, 115, 120, 125, 130, 135, 140, 145, 150, 155, 160, 165, 170, 175, 180, 185, 190, 195, 200, 210, 220, 230, 240, 250, 260, 270, 280, 290, 300, 310, 320, 330, 340, 350, 360, 370, 380, 390, 400, 410, 420, 430, 440, 450, 460, 470, 480, 490, 500, 510, 520, 530, 540, 550, 560, 570, 580, 590, 600, 610, 620, 630, 640, 650, 660, 670, 680, 690, 700, 710, 720, 730, 740, 750, 760, 770, 780, 790, 800, 810, 820, 830, 840, 850, 860, 870, 880, 890, 900, 910, 920, 930, 940, 950, 960, 970, 980, 990, hoặc 1000 nucleotit theo chiều dài, trong đó theo nội dung thuật ngữ này "khoảng" có nghĩa là chiều dài trình tự nucleotit tham khảo cộng hoặc trừ 10% chiều dài tham khảo.

"Phần trăm (%) trình tự axit nucleic tương đồng" với CD79b mã hóa trình tự axit nucleic được xác định ở đây là được xác định là phần trăm nucleotit trong trình tự quan tâm mà giống với nucleotit trong trình tự axit nucleic CD79b quan tâm, sau khi sắp xếp trình tự và đưa kẽ hở vào, nếu cần, để đạt được phần trăm trình tự tối đa tương đồng. Việc sắp xếp nhằm mục đích xác định phần trăm trình tự axit nucleic tương đồng có thể đạt được theo nhiều cách khác nhau mà đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính hiện đã biết rộng rãi như

phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Đối với mục đích này, tuy nhiên, giá trị % trình tự axit nucleic tương đồng được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2, trong đó mã nguồn hoàn thành đối với chương trình ALIGN-2 được nêu trong Bảng 1 dưới đây. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc. và mã nguồn được thể hiện trong Bảng 1 dưới đây đã được nộp với tài liệu của người sử dụng ở U.S. Copyright Office, Washington D.C., 20559, trong đó được đăng ký dưới U.S. Copyright Registration No. TXU510087. Chương trình ALIGN-2 hiện đã biết rộng rãi qua Genentech, Inc., South San Francisco, California hoặc có thể được xuất bản từ mã nguồn được nêu trong Bảng 1 dưới đây. Chương trình ALIGN-2 sẽ được xuất bản để sử dụng hệ điều hành UNIX, tốt hơn là UNIX V4.0D số. Tất cả tham biến so sánh trình tự là được đặt bởi chương trình ALIGN-2 không thay đổi.

Trong các trường hợp trong đó ALIGN-2 được dùng để so sánh trình tự axit nucleic, % trình tự axit nucleic tương đồng của trình tự axit nucleic đã nêu C với hoặc đối với trình tự axit nucleic đã nêu D (mà có thể thay đổi được tạo pha như trình tự axit nucleic đã nêu C mà có hoặc bao gồm một số % trình tự axit nucleic tương đồng với hoặc đối với trình tự axit nucleic đã nêu D) là được tính toán như sau:

100 lần phân số W/Z

trong đó W là số nucleotit được ghi điểm giống nhau thích hợp bởi chương trình sắp xếp trình tự ALIGN-2 theo sự sắp xếp của chương trình của C và D, và trong đó Z là tổng số nucleotit trong D. Sẽ thích hợp rằng nếu chiều dài của trình tự axit nucleic C là không bằng với chiều dài của trình tự axit nucleic D, % trình tự axit nucleic tương đồng của C với D sẽ không bằng với % trình tự axit nucleic tương đồng của D với C. Trừ phi có quy định khác, tất cả giá trị % trình tự axit nucleic tương đồng thu được như được mô tả trong đoạn ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Theo phương án khác, biến thể CD79b polynucleotit là phân tử axit nucleic mà mã hoá CD79b polypeptit mà có khả năng lai, tốt hơn là dưới các điều kiện lai và điều kiện rửa nghiêm ngặt, với trình tự nucleotit mã hoá toàn bộ chiều dài CD79b polypeptit như được mô tả ở đây. Biến thể CD79b polypeptit có thể là biến thể được mã hoá bởi biến thể CD79b polynucleotit.

Thuật ngữ "vùng mã hoá toàn bộ chiều dài" khi được sử dụng tham khảo đến axit nucleic mã hoá CD79b polypeptit đề cập đến trình tự nucleotit mà mã hoá toàn bộ chiều dài CD79b polypeptit theo sáng chế (mà thường được thể hiện giữa các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc, bao gồm chúng, trong các Fig. kèm theo). Thuật ngữ "vùng mã hoá toàn bộ chiều dài" khi được sử dụng tham khảo đến axit nucleic được lưu giữ ATCC đề cập đến phần mã hoá CD79b polypeptit của ADN bổ trợ mà được chèn vào vectơ được lưu giữ với ATCC (mà thường được thể hiện giữa các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc, bao gồm chúng, trong các Fig. kèm theo (các mã bộ ba khởi đầu và kết thúc được tạo nét đậm và không được gạch chân trong các Fig.)).

"Được phân lập," khi được sử dụng để mô tả các CD79b polypeptit khác nhau được mô tả ở đây, có nghĩa là polypeptit mà đã được nhận biết và tách và/hoặc thu hồi từ hợp phần của môi trường tự nhiên của nó. Các hợp phần gây ô nhiễm của môi trường tự nhiên của nó là các nguyên liệu mà thường cản trở việc sử dụng điều trị bệnh đối với polypeptit và có thể bao gồm các enzym, hormon và các chất hoà tan protein hoặc không protein khác. Theo các phương án được ưu tiên, polypeptit sẽ được tinh chế (1) đến mức độ đủ để thu được ít nhất là 15 gốc của trình tự axit amin tận cùng N hoặc bên trong bằng cách sử dụng chất tạo trình tự cup quay hoặc (2) đến độ đồng nhất bởi SDS-PAGE dưới các điều kiện không khử hoặc khử bằng cách sử dụng xanh Coomassie hoặc, tốt hơn là, nhuộm bạc. Polypeptit được phân lập bao gồm polypeptit *in situ* trong các tế bào tái tổ hợp, do ít nhất là một hợp phần của môi trường tự nhiên CD79b polypeptit sẽ không có mặt. Thông thường, tuy nhiên, polypeptit được phân lập sẽ được điều chế bởi ít nhất là một bước tinh chế.

CD79b polypeptit "được phân lập" mã hóa axit nucleic hoặc polypeptit khác mã hóa axit nucleic là phân tử axit nucleic mà được nhận biết và được tách từ ít nhất là một phân tử axit nucleic gây ô nhiễm với mà thường được kết hợp với nguồn tự nhiên của polypeptit mã hóa axit nucleic. Polypeptit được phân lập mã hóa phân tử axit nucleic là khác với dạng hoặc đặt trong đó mà nó được phát hiện trong tự nhiên. Polypeptit được phân lập mã hóa phân tử axit nucleic do đó khác biệt với polypeptit đặc hiệu mã hóa phân tử axit nucleic như nó tồn tại trong tế bào tự nhiên. Tuy nhiên, polypeptit được phân lập mã hóa phân tử axit nucleic bao gồm polypeptit mã hóa phân tử axit nucleic được chứa trong tế bào mà thường biểu hiện polypeptit trong đó, ví dụ, phân tử axit nucleic là vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí của tế bào tự nhiên.

Thuật ngữ "trình tự đối chứng" đề cập đến trình tự ADN cần để biểu hiện trình tự mã hóa được liên kết hiệu quả trong sinh vật chủ cụ thể. Các trình tự đối chứng mà thích hợp đối với sinh vật chưa có nhân điển hình, ví dụ, bao gồm đoạn khởi đầu, tuỳ ý trình tự vận hành, và vị trí gắn kết ribosom. Các tế bào sinh vật nhân điển hình là đã biết để sử dụng đoạn khởi đầu, các tín hiệu polyadenyl hóa và các gen tăng cường.

Axit nucleic là "được liên kết hiệu quả" khi được đặt vào mối quan hệ chức năng với trình tự axit nucleic khác. Ví dụ, ADN đối với gen dẫn đầu tiền trình tự và kích thích bài tiết được liên kết hiệu quả với ADN đối với polypeptit nếu nó được biểu hiện như tiền protein mà tham gia vào tiết polypeptit; đoạn khởi đầu hoặc gen tăng cường được liên kết hiệu quả với trình tự mã hóa nếu nó tác động đến sự sao chép của trình tự; hoặc vị trí gắn kết ribosom được liên kết hiệu quả với trình tự mã hóa nếu nó được định vị sao cho tạo thuận lợi cho sao chép. Thông thường, "được liên kết hiệu quả" có nghĩa rằng trình tự ADN sẽ được liên kết là liền kề, và, trong trường hợp gen dẫn đầu bài tiết, liền kề và đọc pha. Tuy nhiên, gen tăng cường không có liền kề. Tạo liên kết được kết thúc bằng cách thắt ở các vị trí giới hạn thông thường. Nếu các vị trí này không tồn tại, các chất khớp oligonucleotit tổng hợp hoặc cầu liên kết được sử dụng theo thực tiễn thông thường.

"Tính nghiêm ngặt" của các phản ứng lai có thể được xác định dễ dàng bởi chuyên gia trong lĩnh vực này và thường tính toán theo kinh nghiệm phụ thuộc ngay vào chiều dài đầu dò, nhiệt độ rửa và nồng độ muối. Thông thường, các đầu dò dài hơn cần nhiệt độ cao hơn để nung đúng, trong khi các đầu dò ngắn hơn cần nhiệt độ thấp hơn. Việc lai thường phụ thuộc vào khả năng làm biến tính ADN để nung lại khi các sợi bổ sung có mặt trong môi trường thấp hơn nhiệt độ nóng chảy của chúng. Mức tương đồng mong muốn cao hơn giữa đầu dò và trình tự có thể lai, nhiệt độ tương đối cao hơn có thể được sử dụng. Do đó, nó cho phép nhiệt độ tương đối cao hơn có xu hướng tạo ra điều kiện phản ứng nghiêm ngặt hơn, trong khi nhiệt độ cũng thấp hơn. Đối với các chi tiết bổ sung và giải thích tính nghiêm ngặt của các phản ứng lai, xem Ausubel *et al.*, Current Protocols in Molecular Biology, Wiley Interscience Publishers, (1995).

"Các điều kiện nghiệm ngặt" hoặc "điều kiện nghiêm ngặt cao", như được xác định ở đây, có thể được nhận biết bởi: (1) dùng cường độ ion thấp và nhiệt độ rửa cao, ví dụ 0,015M natri clorua/0,0015 M natri xitrat/0,1% natri dodexyl sulfat ở 50°C; (2)

dùng chất làm biến tính trong khi lai, như formamit, ví dụ, 50% (thể tích) formamit với 0,1% albumin huyết thanh bò/0,1% Ficoll/0,1% polyvinylpyrolidon/50mM chất đệm natri phosphatt ở độ pH = 6,5 với 750 mM natri clorua, 75mM natri xitrat ở 42°C; hoặc (3) dùng 50% formamit, 5 x SSC (0,75M NaCl, 0,075 M natri xitrat), 50mM natri phosphat (độ pH = 6,8), 0,1% natri pyrophosphat, 5 x dung dịch Denhardt, ADN của tinh dịch cá hồi tạo nhấp nháy (50µg/ml), 0,1% SDS, và 10% dextran sulfat ở 42°C, kèm rửa ở 42°C trong 0,2 x SSC (natri clorua/natri xitrat) và 50% formamit ở 55°C, tiếp theo bằng cách rửa nghiêm ngặt cao bao gồm 0,1 x SSC chứa EDTA ở 55°C.

"Các điều kiện lai nghiêm ngặt ở mức độ vừa phải" có thể được nhận biết như được mô tả bởi Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual, New York: Cold Spring Harbor Press, 1989, và bao gồm việc sử dụng dung dịch rửa và điều kiện lai (*ví dụ*, nhiệt độ, cường độ ion và %SDS) ít nghiêm ngặt mà được mô tả trên đây. Ví dụ về các điều kiện nghiêm ngặt vừa phải là ủ qua đêm ở 37°C trong dung dịch bao gồm: 20% formamit, 5 x SSC (150mM NaCl, 15mM trinatri xitrat), 50mM natri phosphat (độ pH = 7,6), 5 x dung dịch Denhardt, 10% dextran sulfat và 20 mg/ml ADN tinh trùng cá hồi được làm biến tính, tiếp theo bằng cách rửa các chất lọc trong 1 x SSC ở khoảng 37-50°C. Chuyên gia trong lĩnh vực này nhận biết việc điều chỉnh nhiệt độ, cường độ ion, v.v.. như thế này nếu cần để cung cấp các yếu tố như chiều dài đầu dò và tương tự.

Thuật ngữ "epitop tag" khi được sử dụng ở đây đề cập đến polypeptit khảm bao gồm CD79b polypeptit hoặc kháng thể kháng CD79b được dung hợp với "tag polypeptit". Tag polypeptit có các gốc đủ để tạo ra epitop để mà kháng thể được tạo ra, chưa đủ ngắn sao cho nó không cản trở hoạt tính của polypeptit mà nó được dung hợp. Tag polypeptit tốt hơn là cũng đồng nhất sao cho kháng thể về căn bản là không phản ứng ngang với các epitop khác. Các tag polypeptit thích hợp thường có ít nhất là sáu gốc axit amin và thường nằm trong khoảng từ 8 đến 50 gốc axit amin (tốt hơn là, nằm trong khoảng từ 10 đến 20 gốc axit amin).

"Hoạt tính" đối với mục đích ở đây đề cập đến (các) dạng CD79b polypeptit mà vẫn có hoạt tính sinh học và/hoặc miễn dịch của CD79b nguyên gốc hoặc xuất hiện tự nhiên, trong đó hoạt tính "sinh học" đề cập đến chức năng sinh học (ức chế hoặc kích thích) gây ra bởi CD79b nguyên gốc hoặc xuất hiện tự nhiên khác với khả năng cảm biến tạo ra kháng thể kháng epitop kháng nguyên có bởi CD79b nguyên gốc hoặc xuất

hiện tự nhiên và hoạt tính "miễn dịch" đề cập đến khả năng cảm biến tạo ra kháng thể kháng epitop kháng nguyên có bởi CD79b nguyên gốc hoặc xuất hiện tự nhiên.

Thuật ngữ "chất đối kháng" được sử dụng với nghĩa rộng nhất, và bao gồm phân tử bất kỳ mà phong bế một phần hoặc hoàn toàn, ức chế hoặc làm trung hòa hoạt tính sinh học của CD79b polypeptit nguyên gốc. Theo cách tương tự, thuật ngữ "chất chủ vận" được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm phân tử bất kỳ mà mô phỏng hoạt tính sinh học của CD79b polypeptit nguyên gốc. Các phân tử chất chủ vận hoặc chất đối kháng thích hợp đặc biệt bao gồm các kháng thể chủ vận hoặc đối kháng hoặc mảnh kháng thể, mảnh hoặc biến thể trình tự axit amin của CD79b polypeptit nguyên gốc, peptit, oligonucleotit nghĩa ngược, phân tử hữu cơ nhỏ, v.v.. Các phương pháp để nhận biết chất chủ vận hoặc chất đối kháng của CD79b polypeptit có thể bao gồm cho CD79b polypeptit tiếp xúc với phân tử chất chủ vận hoặc chất đối kháng quan tâm và xác định thay đổi có thể phát hiện trong một hoặc nhiều hoạt tính sinh học thường kết hợp với CD79b polypeptit.

"Được tinh chế" có nghĩa là phân tử có mặt trong mẫu ở nồng độ ít nhất là 95% khối lượng hoặc ít nhất là 98% khối lượng của mẫu trong đó nó được chứa.

Phân tử axit nucleic "được phân lập" là phân tử axit nucleic mà được tách từ ít nhất là một phân tử axit nucleic khác mà nó thường kết hợp, ví dụ, trong môi trường tự nhiên của nó. Phân tử axit nucleic được phân lập còn bao gồm phân tử axit nucleic được chứa trong tế bào mà thường biểu hiện phân tử axit nucleic, nhưng phân tử axit nucleic là có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể mà khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

Thuật ngữ "vectơ," như được sử dụng ở đây, nhằm đề cập đến phân tử axit nucleic có khả năng vận chuyển axit nucleic khác và vị trí mà nó đã được liên kết. Một kiểu vectơ là "plasmit", mà đề cập đến vòng ADN sợi kép dạng vòng mà các mảnh ADN có thể được thắt. Kiểu khác của vectơ là vectơ thể thực khuẩn. Kiểu khác của vectơ là vectơ vi rút, trong đó các mảnh ADN bổ sung có thể được thắt thành hệ gen vi rút. Một số vectơ có khả năng sao chép tự trị ở tế bào chủ mà chúng được chèn vào (ví dụ, vectơ vi khuẩn có điểm khởi đầu sao chép vi khuẩn và vetơ động vật có vú bổ sung). Vectơ khác (ví dụ, vectơ động vật có vú không bổ sung) có thể được kết hợp thành hệ gen của tế bào chủ ngay khi chèn vào tế bào chủ và nhờ đó được sao chép cùng với hệ gen chủ. Ngoài ra, một số vectơ có khả năng hướng sự biểu hiện

của gen mà chúng được liên kết hiệu quả. Vectơ này được đề cập ở đây là "vectơ biểu hiện tái tổ hợp" (hoặc thường là, "vectơ tái tổ hợp"). Thông thường, vectơ biểu hiện sử dụng trong các kỹ thuật ADN tái tổ hợp thường ở dạng plasmit. Theo phương án này, "plasmit" và "vectơ" có thể được sử dụng thay thế cho nhau như plasmit là dạng được sử dụng thông thường nhất của vectơ.

"Polynucleotit" hoặc "axit nucleic," như được sử dụng ở đây thay thế cho nhau, đề cập đến các nucleotit có chiều dài bất kỳ và bao gồm ADN và ARN. Các nucleotit có thể là deoxyribonucleotit, ribonucleotit, nucleotit được cải biến hoặc bazơ và/hoặc các chất tương đương của chúng hoặc chất bất kỳ mà có thể được kết hợp thành polyme bởi ADN hoặc ARN polymeraza hoặc bằng phản ứng tổng hợp. Polynucleotit có thể bao gồm các nucleotit được cải biến, như nucleotit được metyl hoá và các chất tương đương của chúng. Nếu có mặt, cải biến với cấu trúc nucleotit có thể được truyền trước hoặc sau khi kết hợp polyme. Trình tự của nucleotit có thể bị phá vỡ bởi các hợp phần không nucleotit. Polynucleotit còn có thể được cải biến sau khi tổng hợp, như bằng cách liên hợp với chất đánh dấu. Các kiểu khác của cải biến bao gồm, ví dụ, "cap", thay thế một hoặc nhiều nucleotit xuất hiện tự nhiên với chất tương đương, các cải biến trong nucleotit như, ví dụ, các chất với các liên kết không mang điện tích (ví dụ, metyl phosphonat, phosphotrieste, phosphoamidat, carbamat, v.v..) và với các liên kết mang điện tích (ví dụ, phosphorothioat, phosphorodithioat, v.v.), chứa các phần treo, như, ví dụ, protein (ví dụ, nucleaza, độc tố, kháng thể, peptit tín hiệu, ply-L-lysin, v.v.), với các intercalator (ví dụ, acridin, psoralen, v.v.), chứa các chất tạo chelat (ví dụ, kim loại, kim loại phóng xạ, bo, kim loại oxy hoá, v.v.), chứa các chất tạo alkyl, với các liên kết được cải biến (ví dụ, axit alpha anomeric nucleic, v.v.), cũng như các dạng không được cải biến của (các) polynucleotit. Ngoài ra, nhóm hydroxyl bất kỳ thường có mặt trong đường có thể được thay thế, ví dụ, bởi các nhóm phosphonat, các nhóm phosphat, được bảo vệ bởi các nhóm bảo vệ tiêu chuẩn hoặc được hoạt hoá để tạo ra các liên kết bổ sung với nucleotit bổ sung hoặc có thể được liên hợp với chất trợ rắn hoặc bán rắn. OH tận cùng 5' và 3' có thể được phosphoryl hoá hoặc được thế với các nhóm amin hoặc các phần nhóm bao hữu cơ có từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon. Các hydroxyl khác cũng có thể được tạo dẫn xuất thành các nhóm bảo vệ tiêu chuẩn. Các polynucleotit cũng có thể chứa các dạng tương tự của đường riboza hoặc deoxyriboza mà thường đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm, ví dụ, 2'-O-metyl-, 2'-O-allyl, 2'-flo-

hoặc 2'-azido-riboza, các chất tương tự đường của vòng cacbon, các đường .alpha.-anomeric, các đường epime như arabinoza, xyloza hoặc lyxoza, các đường pyranoza, các đường furanoza, sedoheptuloza, các chất tương tự không vòng và các chất tưwng tự nucleosit không bazơ như metyl ribosit. Một hoặc nhiều liên kết phosphodieste có thể được thay thế bởi các nhóm liên kết khác nhau. Các nhóm liên kết khác nhau này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các phương án trong đó phosphat được thay thế bởi P(O)S("thioat"), P(S)S ("dithioat"), "(O)NR.sub.2 ("amidat"), P(O)R, P(O)OR', CO hoặc CH.sub.2 ("formaxetal"), trong đó mỗi R hoặc R' độc lập là H hoặc alkyl (1-20 C.) được thế hoặc không được thể tuỳ ý chứa liên kết (-O-), aryl, alkenyl, xycloalkyl, xycloalkenyl hoặc araldyl. Không phải tất cả liên kết trong polynucleotit cần phải giống nhau. Mô tả trên đây áp dụng cho tất cả polynucleotit được đề cập ở đây, bao gồm ARN và ADN.

"Oligonucleotit," như được sử dụng ở đây, thường đề cập đến các polynucleotit tổng hợp gắn, thường là sợi đơn mà thường là, nhưng không cần thiết, ít hơn khoảng 200 nucleotit theo chiều dài. Thuật ngữ "oligonucleotit" và "polynucleotit" là không loại trừ lẫn nhau. Mô tả trên đây đối với polynucleotit là có thể áp dụng cân bằng và hoàn toàn với oligonucleotit.

Thuật ngữ "bệnh ung thư" đề cập hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở động vật có vú mà thường được đặc trưng bởi sự phát triển tế bào không được kiểm soát. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, ung thư tế bào tạo máu hoặc bệnh ung thư liên quan đến máu, như u lympho, bệnh bạch cầu, bệnh u tuỷ hoặc khối u ắc tính tế bào bạch huyết, nhưng cả các bệnh ung thư lá lách và bệnh ung thư hạch bạch huyết và ung thư biểu mô ung thư tế bào phôi và ung thư mô liên kết. Các ví dụ cụ thể hơn về bệnh ung thư bao gồm bệnh ung thư liên quan đến tế bào B, bao gồm ví dụ, u lympho ở mức cao, trung bình và thấp (bao gồm u lympho tế bào B như, ví dụ, u lympho tế bào B mô bạch huyết liên quan đến niêm mạc và u lympho không Hodgkin (NHL), u bạch huyết tế bào vỏ, Burkitt u lympho, bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, u lympho vùng biên, khuếch tán u lympho tế bào lớn, u lympho dạng nang và Hodgkin u lympho và u lympho tế bào T) và bệnh bạch cầu (bao gồm bệnh bạch cầu thứ cấp, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), như bệnh bạch cầu tế bào B (CD5+ B tế bào bạch huyết), bệnh bạch cầu u tuỷ, như bệnh bạch cầu u tuỷ cấp tính, bệnh bạch cầu u tuỷ mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào lympho, như bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp

tính (ALL) và loạn u tuỷ), và các bệnh ung thư tế bào tạo huyết khác và/hoặc liên quan đến tế bào B hoặc tế bào T. Cũng được bao gồm là bệnh ung thư tế bào tạo huyết bổ sung, bao gồm bạch cầu đa nhân, như ái kiềm, ưa eozin, ưa nhân và đơn nhân, tế bào hình cây, tiểu huyết cầu, hồng cầu và tế bào giết chết tự nhiên. Cũng được bao gồm là các rối loạn tăng sinh tế bào B ung thư được chọn từ các rối loạn sau đây: u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và u bạch huyết tế bào vỏ. Nguồn gốc của bệnh ung thư tế bào B bao gồm như sau: u lympho tế bào B vùng biên có nguồn gốc tế bào B nhớ ở vùng biên, u lympho dạng nang và và khuếch tán u lympho tế bào B lớn có nguồn gốc từ tế bào tâm ở vùng sáng của các tâm phôi, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính và bệnh bạch cầu tế bào lympho tế bào nhỏ có nguồn gốc ở tế bào B1 (CD5+), u bạch huyết tế bào vỏ có nguồn gốc ở tế bào B nguyên gốc ở vùng bao và Burkitt u lympho có nguồn gốc tâm gây hoại ở vùng tối của các tâm phôi. Các mô bao gồm tế bào tạo huyết được đề cập ở đây là "mô tế bào tạo huyết" bao gồm các mô tuyến ức và tuỷ xương và tế bào bạch huyết ngoại vi như lá lách, hạch bạch huyết, mô bạch huyết liên quan đến màng nhầy như mô bạch huyết liên quan đến bệnh ruột, aminda, miếng vá Peyer và mô ruột thừa và mô bạch huyết liên quan đến màng nhầy khác, ví dụ, lớp lót phế quản. Các ví dụ cụ thể khác về bệnh ung thư bao gồm ung thư tế bào vảy, ung thư phổi tế bào nhỏ, ung thư phổi tế bào khung nhỏ, ung thư tuyến phổi, ung thư phổi tế bào vảy, ung thư màng bụng, ung thư tế bào gan, ung thư dạ dày ruột, ung thư tuyến tuỵ, u thần kinh đệm, ung thư cổ tử cung, ung thư buồng trứng, ung thư gan, ung thư bàng quang, ung thư gan, ung thư vú, ung thư trực tràng, ung thư đại tràng, ung thư biểu mô nội mạc tử cung và ung thư tử cung, ung thư biểu mô tuyến nước bọt, ung thận, ung thư gan, ung thư tuyến tiền liệt, ung thư âm hộ, ung thư tuyến ức, ung thư biểu mô gan, bệnh bạch cầu và các rối loạn tăng sinh tế bào bạch huyết khác và các loại khác của bệnh ung thư đầu và cổ.

"Khối u ắc tính tế bào B" ở đây bao gòm u lympho không Hodgkin (NHL), bao gồm NHL mức thấp/nang, tế bào bạch huyết nhỏ (SL) NHL, NHL mức trung bình/nang, NHL khuếch tán mức trung bình, NHL miễn dịch ở mức cao, NHL tế bào bạch huyết ở mức cao, NHL tế bào nhỏ không được phân tách ở mức cao, bệnh NHL ở

mức lớn, u bạch huyết tế bào vỏ, u lympho liên quan đến AIDS và Waldenstrom's Macroglobulinemia, u lympho không Hodgkin (NHL), bệnh Hodgkin chiếm ưu thế hơn tế bào bạch huyết (LPHD), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ (SLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), NHL không đau bao gồm NHL không đau tái phát và rituximab-NHL không đau dai dẳng; bệnh bạch cầu, bao gồm bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào tóc, bệnh bạch cầu nguyên bào tuỷ mạn tính; u bạch huyết tế bào vỏ; và các khối u ắc tính tế bào tạo huyết khác. Các khối u ắc tính này có thể được xử lý với kháng thể trực tiếp kháng gen đánh dấu bề mặt tế bào B, như CD79b. Các bệnh này được bao gồm ở đây sẽ được điều trị bằng cách dùng kháng thể trực tiếp kháng gen đánh dấu bề mặt tế bào B, như CD79b, và bao gồm việc cùng kháng thể không được liên hợp ("trần") hoặc kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào như được mô tả ở đây. Các bệnh này cũng được bao gồm ở đây để điều trị bằng cách điều trị kết hợp bao gồm kháng thể kháng CD79b hoặc thể liên hợp dược chất kháng thể kháng CD79b theo sáng chế kết hợp với kháng thể hoặc thể liên hợp dược chất kháng thể khác, chất độc tế bào khác, phóng xạ hoặc điều trị khác dùng đồng thời hoặc hàng loạt. Trong phương pháp điều trị ví dụ theo sáng chế, kháng thể kháng CD79b theo sáng chế được dùng kết hợp với kháng thể kháng CD20, globulin miễn dịch hoặc mảnh gắn kết CD20 của chúng, cùng với hoặc theo thứ tự. kháng thể kháng CD20 có thể là kháng thể trần hoặc thể liên hợp kháng thể-dược chất. Trong phương án điều trị kết hợp, kháng thể kháng CD79b là kháng thể theo sáng chế và kháng thể kháng CD20 là Rituxan® (rituximab).

Thuật ngữ "u lympho không Hodgkin" hoặc "NHL", như được sử dụng ở đây, đề cập đến bệnh ung thư hệ bạch huyết khác với u lympho không Hodgkin. Hodgkin u lympho thường có thể được khác biệt với u lympho không Hodgkin bởi sự có mặt của tế bào Reed-Sternberg ở Hodgkin u lympho và không có mặt tế bào này ở u lympho không Hodgkin. Các ví dụ về u lympho không Hodgkin bao gồm bởi thuật ngữ như được sử dụng ở đây bao gồm thuật ngữ sẽ được nhận biết bởi chuyên gia trong lĩnh vực này (ví dụ, bác sỹ hoặc nhà nghiên cứu bệnh ung thư) theo sơ đồ phân loại đã biết trong lĩnh vực này, như sơ đồ Revised European-American Lymphoma (REAL) như được mô tả trong Color Atlas of Clinical Hematology (3rd edition), A. Victor Hoffbrand and John E. Pettit (eds.) (Harcourt Publishers Ltd., 2000). Xem, cụ thể là,

dạnh mục trong Fig. 11.57, 11.58 và 11.59. Các ví dụ cụ thể hơn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, NHL tái phát hoặc dai dẳng, NHL mức thấp đường phái trước, NHL giai đoạn III/IV, NHL kháng hoá trị liệu, bệnh bạch cầu tế bào lympho tiền chất B và/hoặc u lympho, bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính tế bào B và/hoặc bệnh bạch cầu đa bạch huyết và/hoặc bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, u lympho tiền bạch cầu tế bào B, u miễn dịch và/hoặc u lympho u nguyên bào bạch huyết, u lympho u nguyên bào bạch huyết, u lympho tế bào B vùng biên, u lympho tế bao B vùng biên lá lách, MALT u lympho vùng biên ngoại lai, u lympho vùng biên hạch, bệnh bạch cầu tế bào tóc, u tương bào và/hoặc u tuỷ tế bào huyết tương, u lympho mức thấp/nang, NHL mức trung bình/nang, u bạch huyết tế bào vỏ, u lympho tâm nang (nang), NHL khuếch tán mức trung bình, u lympho tế bào B lớn khuếch tán, NHL xâm lấn (bao gồm NHL dòng trước xâm chiếm và NHL tái phát xâm chiếm), NHL tái phát sau hoặc dai dẳng cấy ghép tế bào mầm tự rụng, u lympho tế bào B lớn trung thất so cấp, u lympho phun sơ cấp, NHL u miễn dịch ở mức cao, NHL u bạch huyết ở mức cao, NHL tế bào nhỏ không được phân tách ở mức cao, NHL bệnh lớn, Burkitt u lympho, bệnh bạch cầu tế bào lympho dạng hạt lớn tiền chất (ngoại vi), u sùi dạng nấm và/hoặc hội chứng Sezary, u lympho da (thuộc da), u lympho tế bào lớn tự ghép, u lympho tâm mạch.

"Rối loạn" là tình trạng bất kỳ mà sẽ có lợi từ việc điều trị với chất/phân tử hoặc phương pháp theo sáng chế. Điều này bao gồm rối loạn hoặc bệnh mạn tính hoặc cấp tính bao gồm các tình trạng bệnh lý mà tác động trước động vật có vú với rối loạn theo yêu cầu. Các ví dụ không giới hạn về rối loạn sẽ được điều trị ở đây bao gồm các tình trạng bệnh ung thư như khối u ắc tính và lành tính; khối u ắc tính không bệnh bạch cầu và bạch huyết; bệnh thần kinh, thần kinh đệm, nguyên bào hình sao, tuyến dưới đồi và tuyến khác, đại thực bào, biểu mô, mô đệm và rối loạn khoang phôi mang; và viêm, miễn dịch và các rối loạn liên quan đến hình thành mạch khác. Các rối loạn còn bao gồm các tình trạng bệnh ung thư như rối loạn tăng sinh tế bào B và/hoặc khối tế bào B, ví dụ, u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và u bạch huyết tế bào vỏ.

Thuật ngữ "rối loạn tăng sinh tế bào" và "rối loạn tăng sinh" đề cập đến các rối loạn mà liên quan đến một số mức tăng sinh tế bào không bình thường. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh ung thư.

"Khối u", như được sử dụng ở đây, đề cập đến tế cả sự phát triển tế bào và tăng sinh tế bào khối u, ắc tính hoặc lành tính và tất cả tế bào và mô tiền ung thư và ung thư.

"Bệnh tự miễn dịch" ở đây là bệnh hoặc rối loạn xuất hiện từ và trực tiếp đối với mô hoặc cơ quan của chính cá thể hoặc cùng phân ly hoặc thể hiện của chúng hoặc tình trạng bệnh thu được từ chúng. Trong nhiều rối loạn tự miễn dịch và viêm này, nhiều gen đánh dấu lâm sàng và phòng thí nghiệm có thể tồn tại, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, globulin niệu quá mức, mức tự kháng thể cao, phức kép kháng nguyên-kháng thể lưu giữ ở mô, có lợi ích từ việc điều trị corticosteroit hoặc tự ngăn chặn miễn dịch và tế bào bạch huyết tích tụ ở mô bị ảnh hưởng. Không giới hạn đến lý thuyết bất kỳ liên quan đến bệnh tự miễn dịch qua trung gian tế bào B, được cho rằng tế bào B chứng minh có hiệu quả bệnh lý ở bệnh tự miễn dịch của người thông qua nhiều con đường cơ chế, bao gồm sản xuất tự kháng thể, tạo phức hợp miễn dịch, hoạt hoá tế bào hình cây và tế bào T, tổng hợp xytokin, giải phóng chemokin trực tiếp và tạo ra ổ bệnh gen bạch huyết mới lệch vị trí. Mỗi con đường này có thể tham gia vào các mức khác nhau theo bệnh lý của bệnh tự miễn dịch.

"Bệnh tự miễn dịch" có thể là bệnh của cơ quan cụ thể (nghĩa là, đáp ứng miễn dịch là trực tiếp đặc hiệu chống lại hệ cơ quan như hệ nội tiết, hệ tạo huyết, da, hệ tim phổi, hệ dạ dày ruột và gan, hệ thận, tuyến giáp, tai, hệ thần kinh cơ, hệ thần kinh trung ương, v.v...) hoặc bệnh hệ thống có thể ảnh hưởng đến nhiều hệ cơ quan (ví dụ, luput ban đỏ hệ thống (SLE), viêm khớp dạng thấp, viêm đa cơ, v.v...). Các bệnh được ưu tiên này bao gồm các rối loạn viêm khớp tự miễn dịch (như, ví dụ, viêm khớp dạng thấp, hội chứng Sjogren, bệnh cứng da, luput như SLE và viêm thận luput, viêm đa cơ/viêm da cơ, cryoglobulin huyết, hội chứng kháng thể kháng phospholipit, và chứng viêm khớp do vảy nến), các rối loạn gan và dạ dày ruột tự miễn dịch (như, ví dụ, các bệnh viêm ruột (ví dụ, viêm loét đại tràng và bệnh Crohn), viêm dạ dày tự miễn dịch và thiếu máu ác tính, viêm gan tự miễn dịch, xơ gan mật sơ cấp, viêm đường mật xơ cứng sơ cấp, và bệnh ở bụng), viêm mạch (như, ví dụ, viêm khớp làm giảm ANCA và viêm khớp kết hợp ANCA, bao gồm viêm khớp Churg- Strauss, bệnh u hạt Wegener, và viêm nhiều mạch hiển vi), các rối loạn thần kinh tự miễn dịch (như, ví dụ, đa xơ cứng, hội chứng giật rung cơ mắt, chứng nhược cơ năng, mắt viêm thần kinh tuỷ, bệnh Parkinson, bệnh Alzheimer, và đa dây thần kinh tự miễn dịch), các rối

loạn thận (như, ví dụ, viêm thận tiểu cầu, hội chứng Goodpasture, và bệnh Berger), các rối loạn ngoài da tự miễn dịch (như, ví dụ, bệnh vảy nến, chứng mày đay, chứng phát ban, pemphigut thông thường, dạng pemphigoid bỏng rộp, và luput da ban đỏ), các rối loạn tạo máu (như, ví dụ, ban xuất huyết giảm tiểu cầu, ban xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối, ban xuất huyết sau truyền, và thiếu máu tan huyết tự miễn dịch), chứng xơ vữa động mạch, viêm màng mạch nho, các bệnh nghề nghiệp tự miễn dịch (như, ví dụ, bệnh tai trong và không nghe được), bệnh Behcet, hội chứng Raynaud, ghép cơ quan, và các rối loạn nội tiết tự miễn dịch (như, ví dụ, các bệnh tự miễn dịch liên quan đến đái tháo đường như bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin (IDDM), bệnh Addison, và bệnh tuyến giáp tự miễn dịch (ví dụ, bệnh Graves và viêm tuyến giáp)). Các bệnh này được ưu tiên hơn bao gồm, ví dụ, RA, viêm loét đại tràng, viêm mạch kết hợp ANCA, luput, đa xơ cứng, hội chứng Sjogren, bệnh Graves, IDDM, thiếu máu ác tính, viêm tuyến giáp, và viêm thận tiểu cầu.

Các ví dụ cụ thể về các bệnh tự miễn dịch khác như được xác định ở đây, mà trong một số trường hợp bao gồm các bệnh được liệt kê trên đây, bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, bệnh viêm khớp (cấp tính và mạn tính, bệnh viêm khớp dạng thấp bao gồm bệnh viêm khớp dạng thấp tấn công ở trẻ nhỏ và các gia đoạnh như viêm màng hoạt dịch dạng thấp, bệnh gút hoặc viêm khớp do bệnh gút, bệnh viêm khớp miễn dịch cấp tính, bệnh viêm khớp miễn dịch mạn tính, viêm khớp thoái hoá, typ II colagen gây viêm khớp, viêm khớp do lây nhiễm, viêm khớp Lyme, viêm khớp tăng sinh tế bào, viêm khớp vảy nến, bệnh Still, viêm khớp đốt sống, viêm xương khớp, viêm khớp mạn tính progredient, viêm khớp biến dạng, viêm đa khớp mạn tính nguyên phát, viêm khớp phản ứng, viêm khớp mãn kinh, viêm khớp làm tiêu estrogen và viêm đốt sống cứng khớp/viêm đốt sống dạng thấp), bệnh tăng sinh tế bào bạch huyết tự miễn dịch, bệnh da tăng sinh quá mức viêm, bệnh vảy nến như bệnh vảy nến dạng mảng, bệnh vảy nến gutat, bệnh vảy nến mủ và bệnh vảy nến móng, dị ứng bao gồm bệnh dị ứng như cảm mạo và hội chứng Job, viêm da bao gồm viêm da tiếp xúc, viêm da tiếp xúc mạn tính, viêm da tróc vỏ, viêm da dị ứng, viêm da tiếp xúc dị ứng, chứng phát ban, viêm da herpes, viêm da hình đồng xu, viêm da tiết bã nhờn, viêm da không đặc hiệu, viêm da tiếp xúc chất kích thích ban đầu và viêm da dị ứng, hội chứng IgM quá mức liên kết x, bệnh viêm mắt dị ứng, chứng mày đay như chứng mày đây dị ứng mạn tính và chứng mày đay tự phát mạn tính, bao gồm chứng mày đay tự miễn dịch mạn tính, viêm cơ, viêm đa cơ/viêm da cơ, viêm da cơ trẻ nhỏ, chết hoại biểu bì độc tố, bệnh cứng da (bao gồm bệnh cứng da hệ thống), bệnh xơ cứng như xơ cứng hệ thống, đa xơ cứng (MS) như MS quay quang, MS tích lũy sơ cấp (PPMS), và MS chuyển tái phát (RRMS), sơ cứng hệ thống tiến triển, xơ vữa động mạch, xơ cứng động mạch, xơ cứng khuếch tán, xơ cứng không điều hoà, viêm thần kinh mắt (NMO), bệnh viêm ruột

(IBD) (ví dụ, bệnh Crohn, bệnh dạ dày ruột qua trung gian tự miễn dịch, viêm dạ dày ruột, viêm ruột kết như viêm ruột kết gây loét, viêm loét ruột kết, viêm ruột kết hiển vi, viêm ruột kết tạo keo, viêm ruột kết đa tư thế, viêm ruột non kết gây chết hoại và viêm ruột kết chuyển hoá và bệnh viêm ruột tự miễn dịch), bệnh viêm ruột, viêm mủ da hoại tử, nốt ban đỏ, viêm đường mật xơ cứng sơ cấp, hội chứng nghẽn đường hô hấp, bao gòm hội chứng nghẽn đường hô hấp ở người lớn hoặc cấp tính (acute respiratory distress syndrome-ARDS), viêm màn não, viêm tất cả hoặc một phần màng mạch nho, viêm mống mắt, viêm màng mạch, rối loạn tế bào tạo huyết tự miễn dịch, bệnh vật chủ chống mảnh ghép, phù mạch như phù mạhc di truyền, tổn thương thần kinh sọ như viêm màng não, herpes thời kỳ thai nghén, pemphigut thời kỳ thai nghén, ngừa bìu, sai sót buồng chứng sớm tự miễn dịch, mất tính giác ngẫu nhiên do điều kiện tự miễn dịch, bệnh quan trung gian IgE như tính quá mẫn và dị ứng và viêm mũi dị ứng, viêm não như viêm não Rasmussen và chi và/hoặc viêm não cuống phổi, viêm màng mạch nho như viêm màng mạch nho phía trước, viêm màng mạch nho phía trước cấp tính, viêm màng mạch nho dạng u hạt, viêm màng mạch nho dạng không u hạt, viêm màng mạch nho thuốc kháng nguyên, viêm màng mạch nho phía sau hoặc viêm màng mạch nho tự miễn dịch, viêm tiểu cầu thận (GN) có và không có hội chứng thận như viêm tiểu cầu thận mạn tính hoặc cấp tính như GN sơ cấp, GN qua trung gian miễn dịch, GN màng (bệnh màng thận), GN màng tự phát hoặc bệnh màng thận tự phát, GN màng hoặc tăng sinh màng (MPGN), bao gồm Typ I và Typ II, và GN tiến triển nhanh chóng (RPGN), viêm thận tăng sinh tế bào, sai sót đa tuyến nội tiết tự miễn dịch, chứng viêm quy đầu bao gồm tế bào huyết tương giới hạn quy đầu, viêm bao quy đầu, ban đỏ vòng ly tâm, ban đỏ crôm, ban đỏ đa dạng, u hạt hình vòng, địa y nhẵn, chứng teo xơ cứng địa y, phức địa y mạn tính, địa y gai nhỏ, địa y phẳng, bệnh vảy cá dạng phiến, sừng hoá màng sừng, u sừng tiền ắc tính, viêm mủ da chết hoại, các tình trạng dị ứng và đáp ứng, dị ứng thức ăn, dị ứng dược chất, dị ứng côn trùng, các rối loạn dị ứng hiếm như tế bào bón, phản ứng dị ứng, eczema bao gồm dị ứng hoặc eczema dị ứng, asteatotic eczema, eczema rối loạn tiết mồ hôi và palmoplantar eczema dạng tổ ong, bệnh hen như hen phế quản, hen do phế quản và hen tự tự miễn dịch, các tình trạng bao gồm thấm tế bào T và đáp ứng viêm mạn tính, các phản ứng miễn dịch kháng kháng nguyên ngoại như các nhóm máu A-B-O thai trong thời kỳ thai nghén, các bệnh viêm phổi mạn tính, viêm cơ tim tự miễn dịch, thiếu hụt bám dính bạch cầu, luput, bao gồm viêm thận lupút, viêm não lupút, lupút trẻ nhỏ, lupút không thuộc thận, lupút ngoài thận, lupút hình đĩa và lupút ban đỏ hình đĩa, lupút rụng tóc, SLE, như SLE da hoặc SLE gần cấp tính, hội chứng lupút mới sinh (NLE), và lupút ban đỏ khuếch tán, bệnh đái tháo đường trẻ nhỏ (Typ I), bao gồm IDDM trẻ nhỏ, bệnh đái tháo đường ở người lớn (đái tháo đường Typ II), bệnh đái tháo đường tự miễn dịch, bệnh đái tháo lạt tự phát, bệnh

thận đái tháo đường, bệnh màng lưới đái tháo đường, viêm loét ruột kết đái tháo đường, rối loạn động mạch lớn đái tháo đường, đáp ứng miễn dịch liên quan đến phản ứng quá mức cấp tính và làm chậm qua trung gian bởi xytokin và tế bào bạch huyết T, bệnh lao, bệnh sarcoit, bệnh u hạt bao gồm bệnh u hạt u lympho, chứng mất hạt bạch cầu, viêm mạch (bao gồm viêm mạch lớn như đau cơ dạng thấp và viêm động mạch tế bào khổng lồ (Takayasu), viêm mạch trung gian như bệnh Kawasaki và viêm đa khớp dạng hạt/viêm quang động mạch có hạt, viêm mạch miễn dịch, viêm mạch CNS, viêm mạch da, viêm mạch phản ứng quá mức, viêm mạch chết hoại như viêm mạch chết hoại fibrin và viêm mạch chết hoại hệ thống, viêm mạch âm ANCA và viêm mạch liên quan ANCA như hội chứng Churg-Strauss (CSS), bệnh u hạt Wegener và viêm nhiều mạch hiển vi), viêm động mạch, thiếu máu không tái tạo, thiếu máu tự miễn dịch, thiếu máu tíc cực Coombs, thiếu máu Diamond Blackfan, thiếu máu tan huyết hoặc thiếu máu tan huyết miễn dịch bao gồm thiếu máu tan huyết tự miễn dịch (AIHA), thiếu máu ắc tính (ắc tính do thiếu máu), bệnh Addison, thiếu máu tế bào đỏ nguyên chất hoặc ngừng phát triển (PRCA), thiếu hụt yếu tố VIII, ưa chảy máu A, ưa bạch cầu trung tính tự miễn dịch, chứng giảm tế bào như tan tế bào huyết, chứng giảm bạch cầu, các bệnh bao gồm xuyên cầu bạch huyết, các rối loạn viêm CNS, bệnh Alzheimer, bệnh Parkinson, hội chứng tổn thương đa cơ quan như nhiễm trùng thứ cấp, chấn thương hoặc xuất huyết, các bệnh qua trung gian phức kháng nguyên-kháng thể, bệnh màng nền kháng tiểu cầu thận, hội chứng kháng thể kháng phospholipit, bệnh thần kinh vận động, viêm dây thần kinh dị ứng, bệnh/hội chứng Behçet, hội chứng Castleman, hội chứng Goodpasture, hội chứng Reynaud, hội chứng Sjögren, hội chứng Stevens-Johnson, pemphigut hoặc pemphigus như pemphigut bỏng rộp, pemphigút sẹo (màng nhày), pemphigut da, pemphigut thông thường, pemphigut khối u, pemphigut nang, pemphigus pemphigoit màng nhày và pemphigut ban đỏ, mắc phải bỏng rộp bong biểu bì, viêm mắt, tốt hơn là viêm mắt dị ứng như viêm màng kết dị ứng, bệnh bỏng rộp tuyến tính IgA, tự miễn dịch gây viêm màng kết, bệnh đa nội tiết miễn dịch, bệnh hoặc hội chứng Reiter, tổn thương nhiệt do tình trạng tự miễn dịch, tiền sản giật, rối loạn phức hợp miễn dịch như viêm thận phức hợp miễn dịch, viêm thận qua trung gian kháng thể, rối loạn viêm thần kinh, bệnh đa thần kinh, bệnh thần kinh mạn tính như IgM bệnh đa thần kinh hoặc bệnh thần kinh qua trung gian IgM, chứng giảm tiểu cầu (như được phát triển bởi người bệnh mắc bệnh nhồi máu cơ tim, ví dụ), bao gồm xuất huyết giảm tiểu cầu huyết khối (TTP), xuất huyết sau tiêm truyền (PTP), heparin gây giảm tiểu cầu và giảm tiểu cầu qua trung gian tự miễn dịch hoặc miễn dịch bao gồm, ví dụ, xuất huyết giảm tiêu cầu tự phát (ITP) bao gồm ITP mạn tính hoặc cấp tính, viêm màng cứng như viêm màng cứng phổi tự phát, viêm màng cứng âm hộ, bệnh tự miễn dịch của tinh hoàn và buồng trứng bao gồm viêm tinh hoàn và viêm

buồng trứng tự miễn dịch, giảm hoạt động của tuyến giáp sơ cấp, giảm năng tuyến cận giáp, bệnh tuyến nội tiết tự miễn dịch bao gồm viêm tuyến giáp như viêm tuyến giáp tự miễn dịch, bệnh Hashimoto, viêm tuyến giáp mạn tính (viêm tuyến giáp Hashimoto), hoặc viêm tuyến giáp gần cấp tính, bệnh tuyến giáp tự miễn dịch, giảm hoạt động của tuyến giáp tự phát, bệnh Grave, bệnh mắt Grave (bệnh về mắt hoặc bệnh về mắt liên quan đến tuyến giáp), hội chứng đa tuyến như hội chứng đa tuyến tự miễn dịch, ví dụ, typ I (hoặc hội chứng bệnh đa tuyến nội tiết), hội chứng khối u, bao gồm hội chứng khối u thần kinh như hội chứng nhược cơ Lambert-Eaton hoặc hội chứng Eaton-Lambert, hội chứng đàn ông khó tính hoặc người khó tính, viêm não tuỷ như viêm não tuỷ dị ứngs hoặc dị ứng viêm não tuỷ và viêm não tuỷ dị ứng thử nghiệm (EAE), chứng nhược cơ năng như chứng nhược cơ năng liên quan đến tuyến ức, thoái hoá tiểu não, khối u thần kinh, hội chứng vận động của mắt không được kiểm soát (OMS), và bệnh thần kinh nhạy cảm, bệnh thần kinh vận động dđ tâm, hội chứng Sheehan, viêm gan tự miễn dịch, viêm gan mạn tính, viêm gan lupút, viêm gan tế bào khổng, viêm gan hoạt tính mạn tính hoặc viêm gan hoạt tính mạn tính tự miễn dịch, viêm thành phế nang như viêm thành phế nang khe bạch huyết (LIP), phân huỷ cuống phổi (không cấy ghép) vs NSIP, hội chứng Guillain-Barré, bệnh Berger (bệnh thần kinh IgA), bệnh thần kinh IgA tự phát, bệnh da IgA tuyến tính, bệnh da ưa bạch cầu trung tính sốt cấp tính, bệnh mụn da dưới màng sừng, bệnh da bong lớp gai tạm thời, xơ gan như xơ gan mật sơ cấp và sơ gan phổi, hội chứng bệnh ruột tự miễn dịch, bệnh Celiac hoặc Coeliac, bệnh viêm ruột loét miệng celiac (bệnh ruột gluten), bệnh viêm ruột loét miệng dai dẳng, bệnh viêm ruột loét miệng tự phát, cryoglobulinemia như cryoglobulinemia phức hợp, xơ cứng bên amylotrophic (ALS; bệnh Lou Gehrig), bệnh động mạch vành, bệnh tai tự miễn dịch như bệnh tai trong tự miễn dịch (AIED), mất chức năng thính giác tự miễn dịch, viêm nhiều sụn như viêm nhiều sụn dai dẳng hoặc tái phát hoặc viêm nhiều sụn tái phát, protein mô phế nang phổi, viêm giác mạc như hội chứng Cogan/viêm giác mạc khe không giang mai, liệt Bell, bệnh/hội chứng Sweet, tự miễn dịch mũi đỏ, đau liên quan đến zoster, chứng thoái hoá dạng tinh bột, chứng tăng tế bào bạch huyết không ung thư, chứng tăng tế bào bạch huyết sơ cấp, mà bao gồm tăng tế bào bạch huyết tế bào B đơn dòng (ví dụ, bệnh gamo đơn dòng lành tính và gamo đơn dòng đáng kể không được xác định, MGUS), bệnh thần kinh ngoại vi, hội chứng khối u, bệnh kênh như động kinh, chứng đau nửa đầu, chứng loạn nhịp tim, rối loạn cơ, điếc, mù, liệt chu kỳ và bệnh kênh CNS, bệnh tự kỷ, bệnh viêm cơ, viêm tiểu cầu thận tiêu điểm hoặc mảnh hoặc mảnh tiêu điểm (FSGS), bệnh nhãn áp nội tiết, viêm màng mạch nho củng mạc, viêm màng đệm, rối loạn gan tự miễn dịch, u xơ cơ, sai sót đa tuyến nội tiết, hội chứng Schmidt, viêm tuyến thượng thận, chứng teo dạ dày, chứng mất trí ở tuổi già, bệnh myelin hoá khử như các bệnh myelin hoá khử tự miễn

dịch và bệnh đa dây thần kinh myelin hoá khử mạn tính, hội chứng Dressler, rụng tóc từng vùng, hói hoàn toàn, hội chứng CREST (chứng ngấm vôi, hiện tượng Raynaud, chứng khó nhai thực quản, xơ cứng bì mà giãn mao mạch), sự vô sinh tự miễn dịch nam và nữ, ví dụ, do kháng thể kháng tinh trùng, bệnh mô liên kết hỗn hợp, bệnh Chagas, sốt thấp khớp, xảy thai lặp lại, phổi người trang trại, ban đỏ đa dạng, hội chứng sau trợ tim, hội chứng Cushing, phổi người chim, viêm họng hạt dị ứng, viêm họng tế bào bạch huyết nguyên phát, hội chứng Alport, viêm phế nang như viêm phế nang dị ứng và viên phế nang xơ hoá, bệnh phổi kẽ, phản ứng truyền, bệnh phong, sốt rét, bệnh ký sinh như bệnh leishmania, kypanosomia, bệnh sán máng, bệnh giun đũa, bệnh nấm aspergillus, hội chứng Sampter, hội chứng Caplan, bệnh sốt xuất huyết, viêm màng trong tim, xơ hoá màng trong tim, xơ hoá phổi khe khuếch tán, xơ hoá phổi khe, viêm trung thất xơ hoá, xơ hoá phổi, xơ hoá phổi tự phát, xơ nang, viêm nội nhãn, ban đỏ elevatum et diutinum, chứng tăng hồng cầu bào thai, bào thai ưa eozin, hội chứng Shulman, hội chứng Felty, flariasis, viêm thể mi như viêm thể mi mạn tính, viêm thể mi mạn tính khác loại, viêm mống mắt thể mi (cấp tính hoặc mạn tính) hoặc viêm thể mi Fuch, ban xuất huyết Henoch-Schonlein, nhiễm vi rút thiếu hụt miễn dịch ở người (HIV), SCID, hội chứng suy giảm miễn dịch mắc phải (AIDS), nhiễm vi rút echo, nhiễm trùng (hội chứng đáp ứng viêm hệ thống (SIRS)), nội độc tố, viêm tuỵ, thyroxi, nhiễm parvovirút, nhiễm vi rút rubela, hội chứng sau khi dùng vắc xin, nhiễm rubela bẩm sinh, nhiễm vi rút Epstein-Barr, bệnh quai bị, hội chứng Evan, sai sót tuyến sinh dục tự miễn dịch, chứng múa giật Sydenham, viêm thận sau khuẩn cầu dạng chuỗi, viêm mạch tạo huyết khối ubiteran, tăng chức năng tuyến giáp, động mạch lưng, viêm cứng da, đau nhiều có tế bào khổng, viêm thành phế nang phản ứng quá mức mạn tính, viêm màng kết như viêm chảy mùa xuân, viêm giác kết mạc và viêm giác kết mạc bệnh dịch, hội chứng thận tự phá, bệnh thận thay đổi nhỏ, tổn thương quan hệ tự phát và truyền lại thiếu máu cục bộ, truyền lại cơ quan cấy ghép, tự miễn dịch màng lưới, viêm khớp, viêm phế quản, bệnh nghẽn đường hô hấp/phổi mạn tính, bệnh bụi phổi, bệnh aptơ, viêm miệng aphtơ, các rối loạn xơ cứng động mạch (không đủ mạch máu não) như bệnh não xơ cứng động mạch và bệnh thận xơ cứng động mạch, không tinh trùng, sự tiêu máu tự miễn dịch, bệnh Boeck, globulin huyết, sự co cứng Dupuytren, viêm nội nhãn phacoanaphylactica, viêm ruột dị ứng, bệnh phong ban đỏ dạng hạt, liệt mặt tự phát, hội chứng mỏi mạn tính, bệnh thấp khớp sốt, bệnh Hamman-Rich, mất thính giác thần kinh nhạy cảm, hội chứng đái haemoglobin tự phát, hypogonadism, viêm vùng ruột hồi, giảm bạch cầu, nhiễm khuẩn tăng bạch cầu đơn nhân, viêm tuỷ sống ngang, phù phiếm tự phát sơ cấp, bệnh hư thận, đồng đau mắt (đau mắt đồng cảm), đau mắt sơ sinh, viêm dây thần kinh, u hạt viêm tinh hoàn, viêm tuỵ, viêm đa dễ thần kinh cấp tính, bệnh thối hoại viêm mù da, viêm tuyến giáp

Quervain, chứng teo mắc phải, u tuyến ức không ắc tính, u lympho tuyến ức, bệnh bạch biến, hội chứng sốc độc tố, ngộ độc thức ăn, các điều kiện bao gồm thấm tế bào T, thiếu hụt bám dính bạch cầu, đáp ứng miễn dịch liên quan đến phản ứng quả mức cấp tính và chậm qua trung gian bởi xytokin và tế bào bạch huyết T, các bệnh bao gồm xuyên mạch bạch cầu, hội chứng tổn thương đa cơ quan, các bệnh qua trung gian phức hợp kháng nguyên-kháng thể, bệnh màng giới hạn kháng tiểu cầu thận, bệnh đa tuyến nội tiết tự miễn dịch, viêm buồng trứng, chứng phù phiếm xơ cấp, teo dạ dày tự miễn dịch, bệnh thấp khớp, bệnh mô liên kết hỗn hợp, hội chứng hư thận, viêm đảo tuỵ, sai sót đa nội tiết, hội chứng đa tuyến tự miễn dịch, bao gồm hội chứng đa tuyến typ I, giảm năng tuyến cận giáp tự phát ở người lớn (AOIH), bệnh tim như bệnh tim nở, bệnh bỏng rộp biểu bì mắc phải (EBA), bệnh xuất huyết, viêm cơ tim, hội chứng hư thận, viêm đường mật xơ cứng sơ cấp, viêm xoang có mủ hoặc không có mủ, viêm xoang cấp tính hoặc mạn tính, xương sàng, xương mặt, xương hàm trên hoặc viêm xoang xương bướm, viêm xoang dị ứng, rối loạn liên quan đến ưa eozin như tăng bạch cầu ưa eozin, bạch cầu ưa eozin thấm phổi, hội chứng đau ưa eozin, hội chứng Loffler, viêm phổi ưa eozin mạn tính, viêm phổi tăng bạch cầu ưa eozin nhiệt đới, viêm phổi phế quản nấm aspergillut, aspergillus hoặc hu hạt chứa bạch cầu ưa eozin, tính quá mẫn, bệnh đốt sống, bệnh đốt sống huyết thanh âm, bệnh tự miễn dịch đa tuyến nội tiết, viêm đường mật xơ cứng, màng cứng, episclera, bệnh nấm cadida niêm mạc da mạn tính, hội chứng Bruton, gamaglobulin niệu quá mức tạm thời của trẻ nhỏ, hội chứng Wiskott-Aldrich, hội chứng giãn mao mạch mất điều hoà, angiectasis, các rối loạn tự miễn dịch liên quan đến bệnh chất tạo keo, bệnh thấp như bệnh thấp khớp mạn tính, viêm hạch bạch huyết, giảm đáp ứng huyết áp, rối loạn chức năng mạch, tổn thương mô, chứng thiếu máu cục bộ tim mạch, chứng tăng cảm giác đau, thiếu máu cục bộ thận, thiếu máu cục bộ não và bệnh kết hợp với hình thành mạch, các rối loạn phản ứng quá mức dị ứng, viêm tiểu cầu thận, tổn thương truyền dịch lại, rối loạn thiếu máu cục bộ truyền dịch lại, tổn thương truyền dịch lại mô tim hoặc mô khác, viêm khí quản - phế quản u lympho, bệnh viêm da, bệnh da với các hợp phần viêm cấp tính, sai sót đa cơ quan, bệnh bỏng rộp, chết hoại vỏ thận, viêm màng não mủ cấp tính hoặc các rối loạn viêm hệ thần kinh trung ương, các rối loạn viêm mắt và ổ mắt, hội chứng liên quan đến truyền bạch cầu hạt, xytokin gây độc tố, chứng ngủ rũ, viêm nghiêm trọng cấp tính, viêm dai dẳng mạn tính, viêm bể thận, sự tăng sản nội mạc động mạch, loét tiêu hoá, chứng viêm van tim và chứng lạc nội mạc tử cung. Các bệnh này được đề xuất ở đây sẽ được điều trị bằng cách dùng kháng thể mà gắn kết cho chất đánh dấu bề mặt tế bào B, như CD79b, và bao gồm dùng kháng thể không được liên hợp ("trần") hoặc kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào như được mô tả ở đây. Các bệnh này cũng được đề xuất ở đây sẽ được điều trị bằng cách điều trị kết hợp bao gồm kháng thể

kháng CD79b hoặc thể liên hợp dược chất kháng thể kháng CD79b theo sáng chế kết hợp với kháng thể khác hoặc thể liên hợp kháng thể-dược chất, chất độc tế bào khác, phóng xạ hoặc điều trị khác được dùng đồng thời hoặc theo trình tự.

"Điều trị" hoặc "làm giảm" đề cập đến điều trị chữa bệnh và các phương pháp phòng bệnh hoặc ngăn ngừa, trong đó mục đích là để ngăn ngừa hoặc làm chậm (giảm) trình trạng bệnh hoặc rối loạn được tạo đích. Các nhu cầu điều trị bao gồm điều trị rối loạn cũng như thiên về rối loạn hoặc trong đó rối loạn được ngăn ngừa. Đối tượng hoặc động vật có vú "được điều trị" thành công đối với bệnh ung thư biểu hiện CD79b polypeptit nền, sau khi nhận lượng điều trị của kháng thể kháng CD79b theo các phương pháp theo sáng chế, người bệnh thể hiện việc giảm có thể quan sát và/hoặc có thể xác định hoặc không có mặt của một hoặc nhiều yếu tố sau đây: giảm số lượng tế bào ung thư hoặc không có mặt tế bào ung thư; giảm thích thước khối u; ức chế (nghĩa là, làm chậm đến một số phạm vi và tốt hơn là làm ngừng) sự thâm nhiễm tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại vi bao gồm mở rộng bệnh ung thư vào mô mềm và xương; ức chế (nghĩa là, làm chậm đến một số phạm vi và tốt hơn là làm ngừng) di căn khối u; ức chế, đến một số phạm vi, sự phát triển khối u; và/hoặc làm giảm đến một số phạm vi, một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh ung thư cụ thể; giảm bệnh tật và tử vong và cải thiện chất lượng cuộc sống. Đến phạm vi, kháng thể kháng CD79b có thể ngăn ngừa sự phát triển và/hoặc giết chết tế bào ung thư đang tồn tại, có thể là độc tố tế bào và/hoặc độc tố. Giảm tín hiệu hoặc triệu chứng cũng có thể kết hợp bởi người bệnh.

Các tham biến trên đây để đánh giá điều trị thành công và cải thiện bệnh có thể xác định dễ dàng theo các phương pháp thông thường với bác sỹ. Để điều trị bệnh ung thư, hiệu quả có thể được xác định, ví dụ, bằng cách xác định thời gian tiến triển bệnh (TTP) và/hoặc xác định tốc độ đáp ứng (RR). Sự di căn có thể được xác định bằng các thử nghiệm giai đoạn và bằng cách chụp xương và các thử nghiệm đối với mức canxi và các enzym khác để xác định bề rộng của xương. Các hình ảnh CT cũng có thể được thực hiện để phát hiện đối với bề rộng đến khung xương chậu và hạch bạch huyết theo diện tích. Các tia X ngực và xác định các mức enzym gan bằng cách phương pháp đã biết được sử dụng để phát hiện đối với sự di căn đến phổi và gan, tương ứng. Các phương pháp thông thường khác để kiểm soát bệnh bao gồm siêu âm xuyên vách (TRUS) và sinh thiết kim xuyên vách (TRNB).

Đối với bệnh ung thư bàng quang, mà là bệnh ung thư được định vị hơn, các phương pháp xác định tiến triển bệnh bao gồm đánh giá độc tố tế bào niệu bởi ống soi bàng quang, kiểm soát đối với sự có mặt của máu trong nước tiểu, quan sát đường urothelial bởi hình ảnh siêu âm hoặc ảnh chụp tia X quang bể thận tĩnh mạch, chụp X quang máy tính (CT) và hình ảnh cộng hưởng từ (MRI). Sự có mặt của các di căn khác biệt có thể được thử nghiệm bởi CT bụng, X quang ngực hoặc tạo hình ảnh nuclit phóng xạ xương.

Dùng "mạn tính" để cập đến việc dùng (các) chất theo phương thức liên tục như trái với phương thức dùng cấp tính, sao cho để duy trì hiệu quả (hoạt tính) điều trị ban đầu trong thời gian kéo dài. Dùng "không liên tục" là điều trị mà không được thực hiện liên tục mà không ngắt quãng, nhưng tốt hơn là theo chu trình tự nhiên.)

"Cá thể" là động vật có xương sống. Theo một số phương án, động vật có xương sống là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, động vật trang trại (như bò), động vật thể thao, động vật nuôi kiểng (như mèo, chó và ngựa), động vật linh trưởng, chuột nhà và chuột đồng. Theo một số phương án, động vật có vú là con người.

"Động vật có vú" nhằm mục đích điều trị, làm giảm triệu chứng của bệnh ung thư đề cập đến động vật bất kỳ được phân loại như động vật có vú, bao gồm con người, vật nuôi trong nhà và động vật nuôi trang trại và vườn thú, thể thao hoặc động vật kiểng như chó, mèo, bò, ngựa, lợn cừu, thỏ, v.v.. Tốt hơn là, động vật có vú là con người.

Dùng "kết hợp với" một hoặc nhiều chất điều trị khác bao gồm dùng đồng thời (cùng thời gian) và dùng liên tiếp theo trình tự bất kỳ.

"Các chất mang" như được sử dụng ở đây bao gồm, các chất mang dược dụng, tá dược hoặc chất làm ổn định mà không độc đối với tế bào hoặc động vật có vú sẽ được tiếp xúc với chúng ở các liều và nồng độ được dùng. Thông thường, chất mang sinh lý dụng là dung dịch được đệm độ pH. Các ví dụ về các chất mang sinh lý dụng bao gồm các chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic; polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, arginin hoặc lysin; các monosacarit, disacarit, và các carbohydrat khác bao gồm glucoza,

manoza, hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; các rượu đường như manitol hoặc sorbitol; các chất tạo muối như natri; và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như TWEEN™, polyetylen glycol (PEG), và PLURONICS®.

Thuật ngữ "pha rắn" hoặc "chất trợ rắn" có nghĩa là chất nền không chứa nước mà kháng thể theo sáng chế có thể bám dính hoặc gắn vào. Các ví dụ về các pha rắn bao gồm ở đây bao gồm các pha được tạo thành một phần hoặc hoàn toàn từ thủy tinh (ví dụ, thủy tinh rỗng được kiểm soát), polysacarit (ví dụ, agaroza), polyacrylamit, polystyren, rượu polyvinyl và silic oxit. Theo một số phương án, phụ thuộc vào nội dung, pha rắn có thể bao gồm giếng của đĩa thử nghiệm; theo cách khác nó là cột tinh chế (ví dụ, cột sắc ký ái lực). Thuật ngữ này cũng bao gồm pha rắn không liên tục của các hạt riêng rẽ, như được mô tả trong bằng Mỹ số 4,275,149.

"Liposom" là tá dược nhỏ bao gồm các loại lipit khác nhau, phospholipit và/hoặc chất hoạt động bề mặt mà là hữu ích để phân phát dược chất (như kháng thể CD79b) đến động vật có vú. Các hợp phần của liposom thường được sắp xếp ở dạng hai lớp, tương tự với sự sắp xếp lipit của các màng sinh học.

Phân tử "nhỏ" hoặc phân tử hữu cơ "nhỏ" được xác định ở đây có phân tử lượng nhỏ hơn khoảng 500 Dalton.

"Cá thể," "đối tượng" hoặc "người bệnh" là động vật có xương sống. Theo một số phương án, động vật có xương sống là động vật có vú, động vật có vú bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, động vật trang trại (như bò), động vật thể thao, động nuôi kiểng (như mèo, chó và ngựa), động vật linh trưởng, chuột đồng và chuột nhà. Theo một số phương án, động vật có vú là con người.

Thuật ngữ "dược phẩm" đề cập đến chế phẩm mà ở dạng như để cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính là có hiệu quả và không chứa các hợp phần bổ sung mà có độc tố không thể chấp nhận đối với đối tượng mà chế phẩm này có thể được dùng. Chế phẩm này có thể là tiệt trùng.

Chế phẩm "tiệt trùng" là chất vô trùng không có tất cả vi sinh vật sống và các bào tử của chúng.

"Lượng có hiệu quả" của kháng thể như được mô tả ở đây là lượng đủ để thực hiện mục đích được xác định cụ thể. "Lượng có hiệu quả" có thể được xác định theo kinh nghiệm và theo cách thông thường, liên quan đến mục đích được xác định.

Thuật ngữ "lượng có hiệu quả điều trị" đề cập đến lượng kháng thể hoặc dược chất khác có hiệu quả "điều trị" bệnh hoặc rối loạn ở đối tượng hoặc động vật có vú. Trong trường hợp về bệnh ung thư, lượng có hiệu quả điều trị của dược chất có thể làm giảm số lượng tế bào ung thư; giảm kích thước khối u; ức chế (nghĩa là, làm chậm đến một số mức độ và tốt hơn là làm ngừng) sự thâm nhập của tế bào ung thư vào các cơ quan ngoại vi; ức chế (nghĩa là, làm chậm đến một số mức và tốt hơn là làm ngừng) sự di căn khối u; ức chế, đến một số mức, sự phát triển khối u; và/hoặc làm giảm đến một số mức một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến bệnh ung thư. Xem định nghĩa ở đây về "điều trị". Đến mức độ, dược chất có thể ngăn ngừa sự phát triển và/hoặc giết chết tế bào ung thư, có thể là độc tố tế bào và/hoặc độc tố. "Lượng có hiệu quả phòng ngừa" đề cập đến lượng có hiệu quả, ở liều và trong thời gian cần thiết, để đạt được kết quả phòng ngừa mong muốn. Thông thường nhưng không cần thiết, do liều ngăn ngừa được sử dụng ở đối tượng trước hoặc ở giai đoạn bệnh sớm, lượng có hiệu quả phòng ngừa sẽ ít hơn lượng có hiệu quả điều trị.

"Lượng ức chế sự phát triển" của kháng thể kháng CD79b là lượng có khả năng ức chế sự phát triển của tế bào, đặc biệt là tế bào khối u, ví dụ, tế bào ung thư, *in vitro hoặc in vivo*. "Lượng ức chế sự phát triển" của kháng thể kháng CD79b nhằm mục đích ức chế sự phát triển của tế bào khối u có thể được xác định theo kinh nghiệm và theo cách thông thường.

"Lượng độc tố tế bào" của kháng thể kháng CD79b là lượng có khả năng gây phá vỡ tế bào, đặc biệt là khối u, ví dụ tế bào khối u, *in vitro* hoặc in vivo. "Lượng độc tố tế bào" của kháng thể kháng CD79b nhằm mục đích ức chế sự phát triển của tế bào khối u có thể được xác định theo kinh nghiệm hoặc theo cách thông thường.

"Tế bào biểu hiện CD79b" là tế bào mà biểu hiện CD79b polypeptit nội sinh hoặc được chuyển nhiễm trên bề mặt tế bào ở dạng được tiết. "Bệnh ung thư biểu hiện CD79b" là bệnh ung thư bao gồm các tế bào có CD79b polypeptit có mặt trên bề mặt tế bào hoặc tạo ra và tiết CD79b polypeptit. "Bệnh ung thư biểu hiện CD79b" tuỳ ý tạo ra mức đủ của CD79b polypeptit trên bề mặt tế bào của chúng, sao cho kháng thể kháng CD79b có thể gắn kết với chúng và có hiệu quả điều trị với bệnh ung thư. Theo phương án khác, "bệnh ung thư biểu hiện CD79b" tuỳ ý tạo ra và tiết mức đủ của CD79b polypeptit, sao cho kháng thể chất đối kháng kháng CD79b có thể gắn kết với nó và có hiệu quả điều trị với bệnh ung thư. Liên quan đến bệnh này, chất đối kháng

có thể là oligonucleotit nghĩa ngược mà làm giảm, ức chế hoặc ngăn ngừa sản xuất và tiết CD79b polypeptit được tiết bởi tế bào khối u. Bệnh ung thư mà "biểu hiện quá mức" CD79b polypeptit là bệnh mà có mức CD79b polypeptit cao đáng kể ở bề mặt tế bào của chúng hoặc sản xuất và tiết, được so với tế bào không ung thư của kiểu mô giống nhau. Sự biểu hiện quá mức này có thể gây ra bởi sự khuếch đại gen hoặc bằng cách sao chép hoặc dịch mã gia tăng. Sự biểu hiện quá mức CD79b polypeptit có thể được xác định trong thử nghiệm loại bỏ hoặc dự báo bằng cách đánh giá các mức gia tăng của CD79b protein có mặt trên bề mặt tế bào hoặc được tiết bởi tế bào (ví dụ, qua thử nghiệm hóa miễn dịch bằng cách sử dụng các kháng thể kháng CD79b tạo ra kháng CD79b polypeptit được phân lập mà có thể được tạo ra bằng cách sử dụng kỹ thuật ADN tái tổ hợp từ axit nucleic được phân lập mã hóa CD79b polypeptit; phân tích FACS, v.v..). Theo cách khác hoặc ngoài ra, có thể xác định các mức CD79b polypeptit mã hóa axit nucleic hoặc ARN thông tin ở tế bào, ví dụ, qua lai huỳnh quang *in situ* bằng cách sử dụng axit nucleic dựa trên đầu dò tương ứng với axit nucleic mã hóa CD79b hoặc phần bổ sung của chúng; (FISH; xem WO98/45479 công bố tháng 10, 1998), các kỹ thuật tạo giọt Nam, tạo giọt Bắc hoặc phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) như PCR lượng thời gian thực (RT-PCR). Cũng có thể nghiên cứu sự biểu hiện quá mức CD79b polypeptit bằng cách xác định kháng nguyên chuyển di trong dịch lỏng sinh học như huyết thanh, ví dụ, bằng cách sử dụng các thử nghiệm dựa trên kháng thể (cũng xem, ví dụ, bằng Mỹ số 4,933,294 cấp ngày 12/6/1990; WO91/05264 được công bố ngày 18/4/1991; bằng Mỹ số 5,401,638 cấp ngày 28/3/1995; và Sias et al., J. Immunol. Methods 132:73-80 (1990)). Ngoài thử nghiệm trên đây, các thử nghiệm in vivo khác nhau là hiện đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Ví dụ, có thể cho tế bào trong cơ thể người bệnh tiếp xúc với kháng thể mà thường được đánh dấu với chất đánh dấu có thể phát hiện, ví dụ, chất đồng vị phóng xạ và gắn kết kháng thể với tế bào ở người bệnh có thể được đánh giá, ví dụ bằng cách phân hình bên ngoài đối với hoạt tính phóng xạ hoặc bằng cách phân tích sinh thiết thu được từ người bệnh được tiếp xúc trước với kháng thể.

Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "bám dính miễn dịch" xác định phân tử tương tự kháng thể mà kết hợp gắn kết đặc hiệu protein khác loại ("bám dính") với các chức năng phản ứng kích thích của các miền cố định globulin miễn dịch. Về mặt cấu trúc, bám dính miễn dịch bao gồm dung hợp trình tự axit amin với đặc hiệu gắn kết

mong muốn mà không phải nhận biết kháng nguyên và vị trí gắn kết của kháng thể (*nghĩa là*, là "khác loại"), và trình tự miền cố định của globulin miễn dịch. Phần bám dính của phân tử bám dính miễn dịch thường là trình tự axit amin liền kề bao gồm ít nhất một vị trí gắn kết của thụ thể hoặc phối tử. Trình tự miền cố định globulin miễn dịch trong hút bám miễn dịch có thể thu được từ globulin miễn dịch bất kỳ, như IgG-1, IgG-2, IgG-3, hoặc IgG-4 subtyp, IgA (bao gồm IgA-1 và IgA-2), IgE, IgD hoặc IgM.

Từ "đánh dấu" khi được sử dụng ở đây đề cập đến hợp chất có thể phát hiện hoặc chế phẩm mà được liên hợp trực tiếp hoặc gián tiếp với kháng thể sao cho sinh ra kháng thể "được đánh dấu". Chất đánh dấu có thể phát hiện bởi chính bản thân nó (*ví dụ* đánh dấu đồng vị phóng xạ hoặc đánh dấu huỳnh quang) hoặc trong trường hợp về đánh dấu enzym, có thể xúc tác hóa học khác nhau của hợp chất nền hoặc chế phẩm mà có thể phát hiện.

Thuật ngữ "chất độc tế bào" như được sử dụng ở đây đề cập đến chất ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của tế bào và/hoặc gây phá vỡ tế bào. Thuật ngữ này nhằm bao gồm các chất đồng vị phóng xạ (ví dụ, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32} và các chất đồng vị phóng xạ của Lu), các chất hoá trị liệu ví dụ methotrexat, adriamixin, vinca alkaloit (vincristin, vinblastin, etoposit), doxorubixin, melphalan, mitomyxin C, chlorambuxil, daunorubixin hoặc các chất bổ sung khác, enzym và các mảnh của chúng như enzym thuỷ phân nhân, kháng sinh và các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật bao gồm các mảnh và/hoặc biến thể của chúng và các chất kháng khối u hoặc kháng ung thư khác được mô tả dưới đây. Chất độc tế bào khác được mô tả dưới đâu. Chất diệt khối u làm phá vỡ tế bào khối u.

"Độc tố" là chất có khả năng có tác động bất lợi đối với sự phát triển hoặc tăng sinh tế bào.

"Chất hoá trị liệu" là hợp chất hoá học hữu ích trong điều trị bệnh ung thư, liên quan đến cơ chế hoạt động. Các lớp chất hoá trị liệu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến: các chất tạo alkyl, chất chống trao đổi chất, alkaloit thực vật độc tuỷ sống, các chất kháng sinh độc tố/kháng khối u, các chất ức chế topoisomeraza, kháng thể, chất nhạy sáng và chất ức chế kinaza. Các chất hoá trị liệu bao gồm các hợp chất được sử dụng trong "điều trị đích" và hoá trị liệu thông thường. Các ví dụ về các chất hoá trị liệu bao gồm: erlotinib (TARCEVA®, Genentech/OSI Pharm.), docetaxel

(TAXOTERE®, Sanofi-Aventis), 5-FU (flouracil, 5-flouracil, CAS No. 51-21-8), gemcitabin (GEMZAR®, Lilly), PD-0325901 (CAS No. 391210-10-9, Pfizer), cisplatin (cis-diamin,dicloplatin(II), CAS No. 15663-27-1), carboplatin (CAS No. 41575-94-4), paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), temozolomit (4-metyl-5-oxo- 2,3,4,6,8-pentazabixyclo [4.3.0] nona-2,7,9-trien- 9-carboxamit, CAS No. 85622-93-1, TEMODAR®, TEMODAL®, Schering Plough), tamoxifen ((*Z*)-2-[4-(1,2-diphenylbut-1-enyl)phenoxy]-*N*,*N*-dimetyl-ethanamin, NOLVADEX®, ISTUBAL®, VALODEX®), và doxorubixin (ADRIAMYCIN®), Akti-1/2, HPPD, và rapamyxin.

Các ví dụ về các chất hoá trị liệu bao gồm: oxaliplatin (ELOXATIN®, Sanofi), bortezomib (VELCADE®, Millennium Pharm.), sutent (SUNITINIB®, SU11248, Pfizer), letrozol (FEMARA®, Novartis), imatinib mesylat (GLEEVEC®, Novartis), XL-518 (chất ức chế Mek, Exelixis, WO 2007/044515), ARRY-886 (Mek chất ức chế, AZD6244, Array BioPharma, Astra Zeneca), SF-1126 (PI3K chất ức chế, Semafore Pharmaceuticals), BEZ-235 (PI3K chất ức chế, Novartis), XL-147 (PI3K chất ức chế, Exelixis), PTK787/ZK 222584 (Novartis), fulvestrant (FASLODEX®, AstraZeneca), leucovorin (axit folinic), rapamyxin (sirolimus, RAPAMUNE®, Wyeth), lapatinib (TYKERB®, GSK572016, Glaxo Smith Kline), lonafarnib (SARASAR™, SCH 66336, Schering Plough), sorafenib (NEXAVAR®, BAY43-9006, Bayer Labs), gefitinib (IRESSA®, AstraZeneca), irinotecan (CAMPTOSAR®, CPT-11, Pfizer), tipifarnib (ZARNESTRA™, Johnson & Johnson), ABRAXANE™ (Cremophor-free), albumin-tạo ra chế phẩm hạt nano chứa paclitaxel (American Pharmaceutical Partners, Schaumberg, Il), vandetanib (rINN, ZD6474, ZACTIMA®, AstraZeneca), chloranmbuxil, AG1478, AG1571 (SU 5271; Sugen), temsirolimus (TORISEL®, Wyeth), pazopanib (GlaxoSmithKline), canfosfamit (TELCYTA®, Telik), thiotepa và xyclosphosphamit (CYTOXAN®, NEOSAR®); alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenthiophosphoramit và trimetylomelamin; axetogenin (đặc biệt là bullataxin và bullataxinon); camptothecin (bao gồm chất tương tự tổng hợp topotecan); bryostatin; callystatin; CC-1065 (bao gồm chất tương tự tổng hợp của nó adozelesin, carzelesin và bizelesin); cryptophyxin (cụ thể là cryptophyxin 1 và

cryptophyxin 8); dolastatin; duocarmyxin (bao gồm chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; mù tạt nitơ như chlorambuxil, chlornaphazin, chlorophosphamit, estramustin, ifosfamit, mechlorethamin, mechlorethamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamit, mù tạt uraxil; nitrosourê như carmustin, chlorozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin và ranimnustin; các chất kháng sinh như kháng sinh enediyn (ví dụ, calicheamixin, calicheamixin gamaII, calicheamixin omegaII (Angew Chem. Intl. Ed. Engl. (1994) 33:183-186); dynemixin, dynemixin A; bisphosphonat, như clodronat; esperamicin; cũng như neocarzinostatin chromophore và chất kháng sinh chromoprotein enediyn chromophore liên quan), aclacinomysin, actinomyxin, authramyxin, azaserin, bleomyxin, cactinomyxin, carabixin, carminomyxin, carzinophilin, chromomyxin, dactinomyxin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleucin, morpholino-doxorubixin, cyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrrolino-doxorubixin và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marcellomyxin, mitomycin như mitomycin C, axit mycophenolic, nogalamyxin, olivomycins, peplomyxin, porfiromyxin, puromyxin, quelamyxin, rodorubixin, streptonigrin, streptozocin, tubercidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; kháng trao đổi chất như methotrexat và 5-flouraxil (5-FU); các chất tương tự axit folic như denopterin, methotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất tương tự pyrimidin như ancitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, cytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enocitabin, floxuridin; androgen như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; kháng tuyến thượng thận như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; chất độn axit folic như axit frolinic; aceglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; eniluracil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolcin; diaziquon; elfornithin; elliptinium axetat; epothilon; etoglucid; gallium nitrat; hydroxyurea; lentinan; lonidainin; maytansinoit như maytansin và ansamitocin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; axit podophyllinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; phức hợp PSK® polysacarit (JHS Natural Products, Eugene, OR); razoxan; rhizoxin; sizofiran; spirogermani; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2',2"-trichlorotrietylamin; trichothexen (đặc biệt là độc tố T-2, verracurin A, roridin A và anguidin); urethan; vindesin;

dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gacytosin; arabinosit ("Ara-C"); xyclophosphamit; thiotepa; 6-thioguanin; mercaptopurin; methotrexat; các chất tương tự platin như cisplatin và carboplatin; vinblastin; etoposit (VP-16); ifosfamit; mitoxantron; vincristin; vinorelbin (NAVELBINE®); novantron; teniposit; edatrexat; daunomyxin; aminopterin; capecitabin (XELODA®, Roche); ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); retinoit như axit retinoic; và muối, axit dược dụng và các dẫn xuất của chất bất kỳ trên đây.

Cũng được bao gồm trong định nghĩa về "chất hoá trị liệu" là: (i) các chất kháng hormon mà hoạt động để điều chỉnh hoặc ức chế hoạt tính hormon trên khối u như các chất điều biến kháng estrogen và thụ thể estrogen chọn lọc (SERMs), bao gồm, ví dụ, tamoxifen (bao gồm NOLVADEX®; tamoxifen xitrat), raloxifen, droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và FARESTON® (toremifine xitrat); (ii) các chất ức chế aromataza mà ức chế enzym aromataza, mà điều chỉnh sự sản xuất estrogen ở tuyến thượng thận, như, ví dụ, 4(5)-imidazol, aminoglutethimit, MEGASE® (megestrol axetat), AROMASIN® (exemestan; Pfizer), formestan, fadrozol, RIVISOR® (vorozol), FEMARA® (letrozol; Novartis), và ARIMIDEX® (anastrozol; AstraZeneca); (iii) kháng androgen như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit và goserelin; cũng như troxacitabin (chất tương tự 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); (iv) các chất ức chế protein kinaza như các chất ức chế MEK (WO 2007/044515); (v) các chất ức chế lipit kinaza; (vi) oligonucleotit nghĩa ngược, cụ thể là ức chế sự biểu hiện của gen trong con đường tạo tín hiệu liên quan đến sự tăng sinh tế bào khác thường, ví dụ, PKC-alpha, Raf và H-Ras, như oblimersen (GENASENSE®, Genta Inc.); (vii) ribozym như các chất ức chế sự biểu hiện VEGF (ví dụ, ANGIOZYME®) và caá chất ức chế sự biểu hiện HER2; (viii) các vắc xin như vắc xin điều trị gen, ví dụ, ALLOVECTIN®, LEUVECTIN®, và VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; các chất ức chế topoisomeraza 1 như LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; (ix) các chất chống hình thành mạch như bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); và muối, axit dược dụng và các dẫn xuất của chất bất kỳ trên đây.

Cũng được bao gồm trong định nghĩa về "chất hoá trị liệu" là các kháng thể điều trị như alemtuzumab (Campath), bevacizumab (AVASTIN®, Genentech); cetuximab (ERBITUX®, Imclone); panitumumab (VECTIBIX®, Amgen), rituximab

(RITUXAN®, Genentech/Biogen Idec), pertuzumab (OMNITARG™, 2C4, Genentech), trastuzumab (HERCEPTIN®, Genentech), tositumomab (Bexxar, Corixia), và thể liên hợp kháng thể-dược chất, gemtuzumab ozogamicin (MYLOTARG®, Wyeth).

"Chất ức chế phát triển" khi được sử dụng ở đây đề cập đến hợp chất hoặc chế phẩm mà ức chế sự phát triển của tế bào, đặc biệt là tế bào ung thư biểu hiện CD79b, *in vitro* hoặc in vivo. Do đó, chất ức chế phát triển có thể là chất mà giảm đáng kể tỷ lệ tế bào biểu hiện CD79b ở pha S. Các ví dụ về chất ức chế phát triển bao gồm các chất mà phong bế sự tiến triển chu trình tế bào (ở nơi khác với pha S), như các chất làm ngừng pha G1 và pha M. Các chất phong bế pha M cổ điển bao gồm vincas (vincristin và vinblastin), taxan, và chất ức chế topoisomeraza II như doxorubixin, epirubixin, daunorubixin, etoposit và bleomyxin. Các chất này làm ngừng G1 cũng tràn vào làm ngừng pha S, ví dụ, chất tạo alkyl ADN như tamoxifen, prednison, dacarbazin, mechlorethamin, cisplatin, methotrexat, 5-floraxil, và ara-C. Các thông tin khác có thể được tìm thấy trong The Molecular Basis of Cancer, Mendelsohn and Israel, eds., Chapter 1, entitled "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" by Murakami et al. (WB Saunders: Philadelphia, 1995), especially p. 13. Taxan (paclitaxel và docetaxel) là các dược chất chống ung thư có nguồn gốc từ cây thuỷ tùng. Docetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), có nguồn gốc từ cây thuỷ tùng châu Âu, là chất tương tự bán tổng hợp của paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel và docetaxel thúc đẩy kết hợp vi ống từ các dime ống và làm ổn định vi ống bằng cách ngăn ngừa, polyme hoá khử mà dẫn đến ức chế sự phân bào có tơ trong tế bào.

"Doxorubixin" là chất kháng sinh anthraxyclin. Tên hoá học đầu đủ của doxorubixin là (8S-cis)-10-[(3-amino-2,3,6-trideoxy-α-L-lyxo-hexapyranosyl)oxy]-7,8,9,10-tetrahydro-6,8,11-trihydroxy-8-(hydroxyacetyl)-1-metoxy-5,12-naphthacendion.

Thuật ngữ "xytokin" là thuật ngữ chung đối với protein được giải phóng bởi một quần thể tế bào mà hoạt động trên tế bào khác như các chất trung gian nội bào. Các ví dụ về xytokin này là lymphokin, monokin và polypeptit hormon truyền thống. Lượng được bao gồm, xytokin là hormon phát triển như hormon phát triển của người, hormon phát triển của người N-methionyl và hormon phát triển của bò; hormon tuyến

ức; thyroxin; insulin; proinsulin; relaxin; prorelaxin; hormon glycoprotein như hormon kích thích nang (FSH), hormon kích thích tuyến ức (TSH) và hormon tạo hoàng thể (LH); yếu tố phát triển gan; yếu tố phát triển nguyên bào sợi; prolactin; placental lactogen; yếu tố chết hoại khối u-α và -β; chất ức chế mulerian; peptit liên quan đến gonadotropin của chuột; inhibin; activin; yếu tố phát triển màng trong mạch; integrin; thrombopoietin (TPO); yếu tố phát triển thần kinh như NGF-β; yếu tố phát triển tiểu huyết cầu; yếu tố phát triển biến đổi (TGFs) như TGF-α và TGF-β; yếu tố phát triển tương tự insulin-I và -II; erythropoietin (EPO); các yếu tố osteoinductive; interferon như interferon -α, -β, và -γ; các yếu tố kích thích khuẩn lạc (CSFs) như đại thực bào-CSF (M-CSF); đại thực bào bạch cầu hạt-CSF (GM-CSF); và bạch cầu hạt-CSF (G-CSF); interleukin (ILs) như IL-1, IL- 1a, IL-2, IL-3, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-11, IL-12; yếu tố chết hoại khối u như TNF-α hoặc TNF-ß; và các yếu tố polypeptit khác bao gồm LIF và phối tử kit (KL). Như được ử dụng ở đây, thuật ngữ xytokin bao gồm protein từ nguồn tự nhiên hoặc môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp và các chất tương đương có hoạt tính sinh học của xytokin trình tự nguyên gốc.

Thuật ngữ "gói chèn vào" được sử dụng để cập đến các hướng dẫn thông thường ba gồm trong gói chứa sản phẩm điều trị, mà chứa các thông tin về các chỉ định, sử dụng, liều, dùng, chống chỉ định và/hoặc các cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm điều trị này.

Thuật ngữ "trao đổi chất nội bào" đề cập đến hợp chất thu được từ quy trình trao đổi chất hoặc phản ứng bên trong tế bào trên thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC). Quy trình trao đổi chất hoặc phản ứng có thể là quy trình enzym, như phân tách thuỷ phân protein cầu liên kết peptit của ADC, hoặc thuỷ phân nhóm chức như hydrazon, este, hoặc amit. Các chất trao đổi chất nội bào bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các kháng thể và dược chất tự do mà đã trải qua sự phân tách nội bào sau khi đi vào, khuếch tán, hấp thu hoặc chuyển vào tế bào.

Thuật ngữ "được phân tách nội bào" và "phân tách nội bào" đề cập đến quy trình trao đổi chất hoặc phản ứng bên trong tế bào trên thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) nhờ đó việc gắn kết cộng hoá trị, nghĩa là cầu liên kết, giữa phần dược chất (D) và kháng thể (Ab) là bị phá vỡ, dẫn đến dược chất tự do phân ly khỏi kháng thể trong tế bào. Các phần được phân tách của ADC do đó trao đổi chất nội bào.

Thuật ngữ "sinh khả dụng" đề cập đến khả dụng hệ thống (nghĩa là, các mức máu/huyết thanh) của lượng dược chất đã nêu được dùng cho người bệnh. Tính sinh khả dụng là thuật ngữ tuyệt đối mà cho biết sự xác định thời gian (tốc độ) và tổng lượng (kéo dài) của dược chất đạt được chu trình thông thường từ dạng liều được dùng.

Thuật ngữ "hoạt tính độc tố tế bào" đề cập đến giết chết tế bào, độc tố tế bào hoặc ức chế sự phát triển của ADC hoặc trao đổi chất nội bào của ADC. Hoạt tính độc tố tế bào có thể được biểu hiện như giá trị IC_{50}, mà là cô đặc (mol hoặc khối)/đơn vị thể tích ở đó một nửa ttế bào sống sót.

Thuật ngữ "alkyl" như được sử dụng ở đây đề cập đến gốc hydrocacbon hoá trị một mạch thẳng no hoặc mạch nhánh có từ một đến mười hai nguyên tử cacbon (C_1–C_{12}), trong đó gốc alkyl có thể độc lập được thế tuỳ ý với một hoặc nhiều phần tử thế được mô tả dưới đây. Theo phương án khác, gốc alkyl có từ một đến tám nguyên tử cacbon (C_1–C_8), hoặc từ một đến sáu nguyên tử cacbon (C_1–C_6). Các ví dụ về các nhóm alkyl bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, metyl (Me, $-CH_3$), etyl (Et, $-CH_2CH_3$), 1-propyl (n-Pr, n-propyl, $-CH_2CH_2CH_3$), 2-propyl (i-Pr, i-propyl, $-CH(CH_3)_2$), 1-butyl (n-Bu, n-butyl, $-CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-metyl-1-propyl (i-Bu, i-butyl, $-CH_2CH(CH_3)_2$), 2-butyl (s-Bu, s-butyl, $-CH(CH_3)CH_2CH_3$), 2-metyl-2-propyl (t-Bu, t-butyl, $-C(CH_3)_3$), 1-pentyl (n-pentyl, $-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-pentyl ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_3$), 3-pentyl ($-CH(CH_2CH_3)_2$), 2-metyl-2-butyl ($-C(CH_3)_2CH_2CH_3$), 3-metyl-2-butyl ($-CH(CH_3)CH(CH_3)_2$), 3-metyl-1-butyl ($-CH_2CH_2CH(CH_3)_2$), 2-metyl-1-butyl ($-CH_2CH(CH_3)CH_2CH_3$), 1-hexyl ($-CH_2CH_2CH_2CH_2CH_2CH_3$), 2-hexyl ($-CH(CH_3)CH_2CH_2CH_2CH_3$), 3-hexyl ($-CH(CH_2CH_3)(CH_2CH_2CH_3)$), 2-metyl-2-pentyl ($-C(CH_3)_2CH_2CH_2CH_3$), 3-metyl-2-pentyl ($-CH(CH_3)CH(CH_3)CH_2CH_3$), 4-metyl-2-pentyl ($-CH(CH_3)CH_2CH(CH_3)_2$), 3-metyl-3-pentyl ($-C(CH_3)(CH_2CH_3)_2$), 2-metyl-3-pentyl ($-CH(CH_2CH_3)CH(CH_3)_2$), 2,3-dimetyl-2-butyl ($-C(CH_3)_2CH(CH_3)_2$), 3,3-dimetyl-2-butyl ($-CH(CH_3)C(CH_3)_3$, 1-heptyl, 1-octyl, và tương tự.

Thuật ngữ "alkenyl" đề cập đến gốc hydrocacbon hoá trị một mạch thẳng hoặc phân nhánh có từ hai đến tám nguyên tử cacbon (C_2–C_8) với ít nhất là một vị trí no, nghĩa là liên kết cacbon-cacbon, liên kết đôi sp^2, trong đó gốc alkenyl có thể độc lập được thế tuỳ ý với một hoặc nhiều phần tử thế được mô tả ở đây, và bao gồm các gốc

có các hướng "cis" và "trans" hoặc theo cách khác, hướng "E" và "Z". Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, etylenyl hoặc vinyl (-CH=CH_2), allyl (-CH_2CH=CH_2), và tương tự.

Thuật ngữ "alkynyl" đề cập đến gốc hydrocarbon có hoá trị một mạch thẳng hoặc phân nhánh chứa từ hai đến tám nguyên tử cacbon (C_2–C_8) với ít nhất là một vị trí không no, nghĩa là, liên kết cacbon-cacbon, liên kết ba, trong đó gốc alkynyl có thể độc lập được thế tuỳ ý với một hoặc nhiều phần tử thế được mô tả ở đây. Các ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, etynyl (-C≡CH), propynyl (propargyl, -CH_2C≡CH), và tương tự.

Thuật ngữ "vòng cacbon", "carboxyclyl", "vòng vòng cacbon" và "xycloalkyl" đề cập đến vòng không thơm có hoá trị một, no hoặc không no một phần có từ 3 đến 12 nguyên tử cacbon (C_3–C_{12}) như vòng một vòng hoặc từ 7 đến 12 nguyên tử cacbon như vòng hai vòng. Các vòng cacbon hai vòng có từ 7 đến 12 nguyên tử được sắp xếp, ví dụ, hệ hai vòng [4,5], [5,5], [5,6] hoặc [6,6] và các vòng cacbon hai vòng có 9 hoặc 10 nguyên tử vòng có thể được sắp xếp nhe hệ hai vòng [5,6] hoặc [6,6] hoặc các hệ tạo cầu như hai vòng[2.2.1]heptan, hai vòng[2.2.2]octan và hai vòng [3.2.2]nonan. Các ví dụ về các vòng cacbon một vòng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, 1-xyclopent-1-enyl, 1-xyclopent-2-enyl, 1-xyclopent-3-enyl, xyclohexyl, 1-xyclohex-1-enyl, 1-xyclohex-2-enyl, 1-xyclohex-3-enyl, xyclohexadienyl, xycloheptyl, xycloоctyl, xyclononyl, xyclodecyl, xycloundecyl, xyclododecyl, và tương tự.

"Aryl" có nghĩa là gốc hydrocarbon thơm có hoá trị một có từ 6 đến 20 nguyên tử cacbon (C_6–C_{20}) được tạo dẫn xuất bằng cách loại bỏ một nguyên tử hydro khỏi nguyên tử cacbon đơn của hệ vòng thơm ban đầu. Một số nhóm aryl được thể hiện trong các cấu trúc ví dụ là "Ar". Aryl bao gồm các gốc hai vòng bao gồm vòng thơm được dung hợp với vòng vòng cacbon no, không no một phần hoặc thơm. Các nhóm aryl thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các gốc có nguồn gốc từ benzen (phenyl), benzen được thế, naphthalen, anthraxen, biphenyl, indenyl, indanyl, 1,2-dihydronaphtalen, 1,2,3,4-tetrahydronaphthyl, và tương tự. Các nhóm aryl độc lập được thế tuỳ ý với một hoặc nhiều phần tử thế được mô tả ở đây.

Thuật ngữ "dị vòng," "heterxyclyl" và "vòng dị vòng" được sử dụng thay thế cho nhau ở đây và đề cập đến gốc vòng cacbon no hoặc không no một phần (nghĩa là, có một hoặc nhiều liên kết đôi và/hoặc liên kết ba trong vòng) có từ 3 đến 20 nguyên tử vòng trong đó ít nhất là một nguyên tử vòng là khác loại được chọn từ nitơ, oxy, photpho và lưu huỳnh, các nguyên tử vòng còn lại là C, trong đó một hoặc nhiều nguyên tử vòng độc lập được thế tuỳ ý với một hoặc nhiều phần tử thế được mô tả dưới đây. Dị vòng có thể là vòng đơn có từ 3 đến 7 thành viên của vòng (từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon carbon và từ 1 đến 4 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S) hoặc hai vòng có từ 7 đến 10 thành viên vòng (từ 4 đến 9 nguyên ử cacbon và từ 1 đến 6 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S), ví dụ: hệ hai vòng [4,5], [5,5], [5,6], hoặc [6,6]. Các dị vòng được mô tả trong Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), particularly Chapters 1, 3, 4, 6, 7, and 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), in particular Volumes 13, 14, 16, 19, và 28; và J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566. "Heteroxyclyl" cũng bao gồm các gốc trong đó các gốc dị vòng được dung hợp với vòng no, không no một phần hoặc vòng cacbon thơm hoặc vòng dị vòng. Các ví dụ về các vòng dị vòng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, pyrolidinyl, tetrahydrofuranyl, dihydrofuranyl, tetrahydrothienyl, tetrahydropyranyl, dihydropyranyl, tetrahydrothiopyranyl, piperidino, morpholino, thiomorpholino, thioxanyl, piperazinyl, homopiperazinyl, azetidinyl, oxetanyl, thietanyl, homopiperidinyl, oxepanyl, thiepanyl, oxazepinyl, diazepinyl, thiazepinyl, 2-pyrrolinyl, 3-pyrrolinyl, indolinyl, 2H-pyranyl, 4H-pyranyl, dioxanyl, 1,3-dioxolanyl, pyrazolinyl, dithianyl, dithiolanyl, dihydropyranyl, dihydrothienyl, dihydrofuranyl, pyrazolidinylimidazolinyl, imidazolidinyl, 3-azabicyco[3.1.0]hexanyl, 3-azabixyclo[4.1.0]heptanyl, azabixyclo[2.2.2]hexanyl, 3H-indolyl quinolizinyl và N-pyridyl urê. Các phần spiro cũng được bao gồm trong định nghĩa này. Các ví dụ về nhóm dị vòng trong đó 2 nguyên tử cacbon vòng được thế với phần oxo (=O) là pyrimidinonyl và 1,1-dioxo-thiomorpholinyl. Các nhóm dị vòng ở đây độc lập được thế tuỳ ý với một hoặc nhiều phần tử thế được mô tả ở đây.

Thuật ngữ "heteroaryl" đề cập đến gốc thơm có hoá trị một của vòng 5-, 6-, hoặc 7 cạnh và bao gồm các hệ vòng được dung hợp (ít nhất là một trong số chúng là thơm) chứa 5-20 nguyên tử, chứa một hoặc nhiều nguyên tử khác loại độc lập được

chọn từ nitơ, oxy và lưu huỳnh. Các ví dụ về các nhóm heteroaryl là pyridinyl (bao gồm, ví dụ, 2-hydroxypyridinyl), imidazolyl, imidazopyridinyl, pyrimidinyl (bao gồm, ví dụ, 4-hydroxypyrimidinyl), pyrazolyl, triazolyl, pyrazinyl, tetrazolyl, furyl, thienyl, isoxazolyl, thiazolyl, oxazolyl, isothiazolyl, pyrrolyl, quinolinyl, isoquinolinyl, indolyl, benzimidazolyl, benzofuranyl, cinnolinyl, indazolyl, indolizinyl, phthalazinyl, pyridazinyl, triazinyl, isoindolyl, pteridinyl, purinyl, oxadiazolyl, triazolyl, thiadiazolyl, thiadiazolyl, furazanyl, benzofurazanyl, benzothiophenyl, benzothiazolyl, benzoxazolyl, quinazolinyl, quinoxalinyl, naphthyridinyl, và furopyridinyl. Các nhóm heteroaryl độc lập được thế tuỳ ý với một hoặc nhiều phần tử thế được mô tả ở đây.

Các nhóm dị vòng hoặc heteroaryl có thể là cacbon (liên kết cacbon) hoặc nitơ (liên kết nitơ) được gắn kết nếu có thể. Nhằm mục đích ví dụ và không giới hạn, dị vòng hoặc heteroaryl được gắn kết cacbon được gắn kết ở vị trí 2, 3, 4, 5, hoặc 6 của pyridin, vị trí 3, 4, 5, hoặc 6 của pyridazin, vị trí 2, 4, 5, hoặc 6 của pyrimidin, vị trí 2, 3, 5, hoặc 6 của pyrazin, vị trí 2, 3, 4, hoặc 5 của furan, tetrahydrofuran, thiofuran, thiophen, pyrol hoặc tetrahydropyrol, vị trí 2, 4, hoặc 5 của oxazol, imidazol hoặc thiazol, vị trí 3, 4, hoặc 5 của isoxazol, pyrazol, hoặc isothiazol, vị trí 2 hoặc 3 của aziridin, vị trí 2, 3, hoặc 4 của azetidin, vị trí 2, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 của quinolin hoặc vị trí 1, 3, 4, 5, 6, 7, hoặc 8 của isoquinolin.

Theo cách ví dụ và không giới hạn, dị vòng và heteroaryl được gắn kết nitơ được gắn kết ở vị trí 1 của aziridin, azetidin, pyrol, pyrrolidin, 2-pyrolin, 3-pyrolin, imidazol, imidazolidin, 2-imidazolin, 3-imidazolin, pyrazol, pyrazolin, 2-pyrazolin, 3-pyrazolin, piperidin, piperazin, indol, indolin, 1H-indazol, vị trí 2 của isoindol hoặc isoindolin, vị trí 4 của morpholin và vị trí 9 của carbazol hoặc β-carbolin.

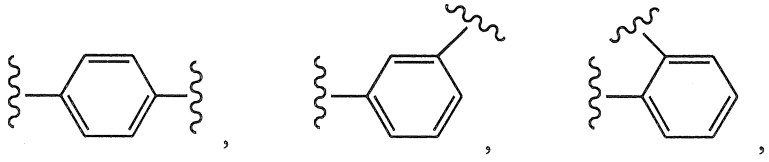
"Alkylen" đề cập đến gốc hydrocarbon mạch no, phân nhánh hoặc thẳng hoặc vòng có từ 1 đến 18 nguyên tử cacbon và có hai tâm gốc hoá trị một được tạo dẫn xuất bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro khỏi các nguyên tử giống nhau hoặc hai nguyên tử hydro khác nhau của alkan ban đầu. Các gốc alkylen thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến: metylen (-CH_2-) 1,2-etyl (-CH_2CH_2-), 1,3-propyl (-$CH_2CH_2CH_2$-), 1,4-butyl (-$CH_2CH_2CH_2CH_2$-), và tương tự.

"C_1-C_{10} alkylen" là mạch thẳng, nhóm hydrocarbon no có công thức -$(CH_2)_{1-10}$-. Các ví dụ về C_1-C_{10} alkylen bao gồm metylen, etylen, propylen, butylen, pentylen, hexylen, heptylen, ocytylen, nonylen và decalen.

"Alkenylen" đề cập đến gốc hydrocarbon không no, phân nhánh hoặc thẳng hoặc vòng có từ 2 đến 18 nguyên tử cacbon và có hai tâm gốc hoá trị một được tạo dẫn xuất bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro khỏi các nguyên tử cacbon giống nhau hoặc hai nguyên tử hydro khác nhau của alken ban đầu. Các gốc alkenylen thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến: 1,2-etylen (-CH=CH-).

"Alkynylen" đề cập đến gốc hydrocarbon không no, phân nhánh hoặc thẳng hoặc vòng có từ 2 đến 18 nguyên tử các bon và có hai tâm gốc hoá trị một được tạo dẫn xuất bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro khỏi các nguyên tử cacbon giống hau hoặc hai nguyên tử cacbon khác nhau của alkyn ban đầu. Các gốc alkynylen thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến: axetylen (-C≡C-), propargyl (-CH_2C≡C-), và 4-pentynyl (-$CH_2CH_2CH_2$C≡C-).

"Arylen" là nhóm aryl mà có hai liên kết cộng hoá trị và có thể ở các cấu hình ortho, meta, hoặc para như được thể hiện trong cấu trúc dưới đây:



trong đó, nhóm phenyl có thể không được thế hoặc được thế với tối đa là bốn nhóm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, -C_1-C_8 alkyl, -O-(C_1-C_8 alkyl), -aryl, -C(O)R', -OC(O)R', -C(O)OR', -C(O)NH_2 , -C(O)NHR', -C(O)N(R')$_2$ -NHC(O)R', -S(O)$_2$R', -S(O)R', -OH, -halogen, -N_3 , -NH_2, -NH(R'), -N(R')$_2$ và -CN; trong đó mỗi R' độc lập được chọn từ H, -C_1-C_8 alkyl và aryl.

"Arylalkyl" đề cập đến gốc alkyl không vòng trong đó một trong số nguyên tử hydro được gắn với nguyên tử cacbon, thường là nguyên tử cacbon tận cùng hoặc sp^3 là được thay thế với gốc aryl. Các nhóm arylalkyl thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, benzyl, 2-phenylethan-1-yl, 2-phenylethen-1-yl, naphthylmetyl, 2-naphthyletan-1-yl, 2-naphthyleten-1-yl, naphthobenzyl, 2-naphthophenylethan-1-yl và tương tự. Nhóm arylalkyl bao gồm từ 6 đến 20 nguyên tử cacbon, ví dụ phần alkyl,

bao gồm alkanyl, alkenyl hoặc các nhóm alkynyl, nhóm arylalkyl từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon và phần aryl từ 5 đến 14 nguyên tử cacbon.

"Heteroarylalkyl" đề cập đến gốc alkyl không vòng trong đó một hoặc nhiều nguyên tử hydro được gắn vào nguyên tử cacbon, thường là nguyên tử cabon tận cùng hoặc sp^3 được thay thế với gốc heteroaryl. Các nhóm heteroarylalkyl thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, 2-benzimidazolylmetyl, 2-furyletyl, và tương tự. Nhóm heteroarylalkyl bao gồm từ 6 đến 20 nguyên tử cacbon, ví dụ phần alkyl, bao gồm các nhóm alkanyl, alkenyl hoặc alkynyl của nhóm heteroarylalkyl từ 1 đến 6 nguyên tử cacbon và phần heteroaryl từ 5 đến 14 nguyên tử cacbon và từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S. Phần heteroaryl của nhóm heteroarylalkyl có thể là một vòng có từ 3 đến 7 cạnh (từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon hoặc hai vòng có từ 7 đến 10 cạnh (từ 4 đến 9 nguyên tử cacbon và từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S), ví dụ: hệ hai vòng [4,5], [5,5], [5,6], hoặc [6,6].

Thuật ngữ "tiền dược chất" như được sử dụng ở đây đề cập đến tiền chất hoặc dẫn xuất của hợp chất theo sáng chế mà có thể có ít độc tố với tế bào được so với hợp chất ban đầu hoặc dược chất và có khả năng được hoạt hoá enzym hoặc thuỷ phân hoặc được chuyển hoá thành dạng ban đầu có hoạt tính hơn. Xem, ví dụ, Wilman, "Prodrugs in Cancer Chemotherapy" Biochemical Society Transactions, 14, pp. 375-382, 615th Meeting Belfast (1986) và Stella et al., "Prodrugs: A Chemical Approach to Targeted Drug Delivery," *Directed Drug Delivery*, Borchardt et al., (ed.), pp. 247-267, Humana Press (1985). Các tiền dược chất theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các tiền dược chất chứa phosphat, các tiền dược chất chứa thiophosphat, các tiền dược chất chứa sulfat, các tiền dược chất chứa peptit, các tiền dược chất được cải biến axit amin D, các tiền dược chất được glycosyl hoá, các tiền dược chất chứa lactam, tuỳ ý là các dược chất chứa phenoxyaxetamit được thế tuỳ ý, các tiền dược chất chứa phenylaxetamit được thế tuỳ ý, 5-floxytosin và các tiền dược chất 5-flouridin khác mà có thể được chuyển hoá thành dược chất không độc tố tế bào hoạt tính hơn. Các ví dụ về các dược chất độc tế bào mà có thể được tạo dẫn xuất thành dạng tiền dược chất để ử dụng theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các hợp chất theo sáng chế và các chất hoá trị liệu như được mô tả trên đây.

"Chất chuyển hoá" là sản phẩm trao đổi chất thông qua trao đổi chất trong cơ thể của hợp chất đặc hiệu hoặc muối của chúng. Trao đổi chất của hợp chất có thể

được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường đã biết trong lĩnh vực này và các hoạt tính của chúng được xác định bằng cách sử dụng các thử nghiệm như được mô tả ở đây. Các sản phẩm này có thể là kết quả ví dụ từ việc oxy hoá, thuỷ phân, amit hoá, amin hoá khử, este hoá, este hoá khử, phân tách enzym và tương tự, hợp chất được dùng. Do đó, sáng chế bao gồm trao đổi chất của hợp chất theo sáng chế, bao gồm các hợp chất được tạo ra bởi quy trình bao gồm cho hợp chất theo sáng chế tiếp xúc với động vật có vú trước thời gian đủ để thu được sản phẩm trao đổi chất của chúng.

"Liposom" là túi nhỏ bao gồm các kiểu lipit khác nhau, phospholipit và/hoặc chất hoạt động bề mặt là hữu ích để phân phát dược chất cho động vật có vú. Các hợp phần của liposom thường được sắp xếp theo sự tạo thành hai lớp, tương tự với sự sắp xếp lipit của các màng sinh học.

"Cầu liên kết" đề cập đến phần hoá học bao gồm liên kết cộng hoá trị hoặc chuỗi nguyên tử mà gắn kết cộng hoá trị kháng thể với phần dược chất. Theo các phương án khác, các cầu liên kết bao gồm gốc hoá trị hai như alkyldiyl, aryldiyl, heteroaryldiyl, các phần như: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, lặp lại các đơn vị của alkyloxy (ví dụ polyetylenoxy, PEG, polymetylenoxy) và alkylamino (ví dụ polyetylenamino, Jeffamin™); và este diaxit và các amit bao gồm sucxinat, sucxinamit, diglycolat, malonat, và caproamit.

Thuật ngữ "không đối xứng" đề cập đến các phân tử mà có đặc tính không đặt lên chất khác của hợp chất tạo hình ảnh phản chiếu, trong khi thuật ngữ "đối xứng" đề cập đến các phân tử mà có thể đặt lên hợp chất tạo hình ảnh phản chiếu của chúng.

Thuật ngữ "chất đồng phân lập thể" đề cập đến các hợp chất mà có cấu trúc hoá học giống nhau, nhưng khác với sự sắp xếp về các nguyên tử hoặc các nhóm trong không gian.

"Chất đồng phân không đối quang" đề cập đến chất đồng phân lập thể với hai hoặc nhiều tâm không đối xứng và toàn bộ phân tử không tạo hình ảnh phản chiếu với hợp chất khác. Các chất đồng phân không đối quang có các đặc tính vật lý khác nhau, ví dụ điểm nóng chảy, điều sôi, các đặc tính quang phổ và các hoạt tính phản ứng. Hỗn hợp gồm các chất đồng phân không đối quang có thể riêng rẽ dưới các quy trình phân tích phân giải cao như điện di và sắc ký.

"Chất đồng phân quang học" đề cập đến hai chất đồng phân quang học của hợp chất mà không tạo hình ảnh phản chiếu có thể đặt lên trên của chất khác.

Các định nghĩa về hoá học lập thể và các quy ước được sử dụng ở đây thường là như sau S. P. Parker, Ed., *McGraw-Hill Dictionary of Chemical Terms* (1984) McGraw-Hill Book Company, New York; và Eliel, E. và Wilen, S., *Stereochemistry of Organic Compounds* (1994) John Wiley & Sons, Inc., New York. Nhiều hợp chất hữu cơ tồn tại ở dạng hoạt tính quang học, nghĩa là chúng có khả năng quay mặt phẳng của ánh sáng phân cực. Theo mô tả hợp chất có hoạt tính quang học, cá tiếp đầu ngữ D và L, hoặc *R* và *S,* được sử dụng để xác định cấu hình tuyệt đối của phân tử về (các) tâm không đối xứng của nó. Các tiếp đầu ngữ d và l hoặc (+) và (-) được dùng để xác định tín hiệu của quay ánh sáng phân cực bởi hợp chất này với (-) hoặc 1 có nghĩa là hợp chất này là levorotatory. Hợp chất được tạo tiếp đầu ngữ với (+) hoặc d là dextrorotatory. Đối với cấu trúc hoá học đã nêu, các chất đồng phân lập thể là giống nhau ngoại trừ chúng là các hình ảnh phản chiếu của chất đồng phân khác. Chất đồng phân lập thể đặc hiệu cũng có thể đề cập đến chất đồng phân quang học và hỗn hợp của các chất đồng phân này thường được gọi là hỗn hợp chất đồng phân đối hình. Hỗn hợp 50:50 của các chất đồng phân quang học được đề cập đến như hỗn hợp raxemic hoặc raxemat, mà có thể xảy ra trong đó đã không có chọn lọc đối quang hoặc đặc hiệu đối quang trong phản ứng hoặc quy trình hoá học. Thuật ngữ "hỗn hợp raxemic" và "raxemat" đề cập đến hỗn hợp mol đương lượng của hai loại chất đồng phân đối hình, không có hoạt tính quang học.

Thuật ngữ "tautome" hoặc "dạng tautome" đề cập đến các chất đồng phân cấu trúc của các năng lượng khác nhau mà có thể chuyển đổi qua lại qua tấm ngăn năng lượng thấp. Ví dụ, proton tautome (cũng đã biết là prototropic tautome) bao gồm các biến đổi qua lại qua dự di trú của proton, như keto-enol và chất đồng phân hoá imin-enamin. Các tautome hoá trị bao gồm các biến đổi qua lại bởi sự nhận biết một số điện tích gắn kết.

Cụm từ "muối dược dụng" như được sử dụng ở đây, đề cập đến các muối hữu cơ hoặc vô cơ dược dụng của hợp chất theo sáng chế. Các muối ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, sulfat, xitrat, axetat, oxalat, clorua, bromua iodua nitrat, bisulfat, phosphat, phosphat axit, isonicotinat, lactat, salixylat, xitrat axit, tartrat, oleat, tanat, pantothenat, bitartrat, ascorbat, sucxinat, maleat, gentisinat, fumarat, gluconat,

glucuronat, saccharat, format, benzoat, glutamat, metansulfonat "mesylat", etansulfonat, benzensulfonat, *p*-toluensulfonat, và pamoat (nghĩa là, 1,1'-metylen-bis(2-hydroxy-3-naphthoat)). Muối dược dụng có thể bao gồm phân tử khác như axetat ion, sucxinat ion hoặc các ion khác. Ion có thể là phần hữu cơ hoặc vô cơ mà làm ổn định điện tích trên hợp chất ban đầu. Ngoài ra, muối dược dụng có thể có nhiều hơn một nguyên tử mang điện tích trong cấu trúc của nó. Các ví dụ trong đó nhiều nguyên tử mang điện tích là phần của muối dược dụng có thể có nhiều ion. Do đó, muối dược dụng có thể có một hoặc nhiều nguyên tử mang điện tích và/hoặc một hoặc nhiều ion.

Nếu các hợp chất theo sáng chế là bazơ, muối dược dụng mong muốn có thể được điều chế bằng phương pháp thích hợp bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, xử lý bazơ tự do với axit vô cơ như axit clohydric, axit bromhydric, axit sulfuric, axit nitric, axit metansulfonic, axit phosphoric và tương tự, hoặc với axit hữu cơ như axit axetic, axit trifloaxetic, axit maleic, axit sucxinic, axit mandelic, axit fumaric, axit malonic, axit pyruvic, axit oxalic, axit glycolic, axit salicylic, axit pyranosidyl, như axit glucuronic hoặc axit galacturonic, axit alpha hydroxy, như axit xitri hoặc axit tartaric, axit amino, như axit aspartic hoặc axit glutamic, axit thơm, như axit benzoic hoặc axit xinamic, axit sulfonic, như axit p-toluensulfonic hoặc axit etansulfonic hoặc tương tự.

Nếu hợp chất theo sáng chế là axit, muối dược dụng có thể được điều chế bởi phương pháp thích hợp bất kỳ, ví dụ xử lý axit tự do với bazơ vô cơ hoặc hữu cơ như amin (bậc một, bậc hai hoặc bậc ba), hydroxit kim loại kiềm hoặc hydroxit kim loại kiềm thổ hoặc tương tự. Các ví dụ minh hoạ về muối thích hợp bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các muối hữu cơ có nguồn gốc từ axit amin như glyxin và arginin, amoniắc, amin bậc một, bậc hai và bậc ba và amin vòng như piperidin, morpholin và piperazin và các muối vô cơ có nguồn gốc từ natri, canxi, kali, magiê, mangan, sắt, đồng, kẽm, nhôm và lithi.

Cụm từ "dược dụng" cho biết rằng chất nền hoặc chế phẩm phản thích hợp về mặt hoá học và/hoặc độc tố sinh học với các thành phần khác bao gồm chế phẩm và/hoặc động vật có vú sẽ được điều trị bằng chế phẩm này.

"Solvat" đề cập đến sự kết hợp hoặc phức hợp của một hoặc nhiều phân tử dung môi và hợp chất theo sáng chế. Các ví dụ về các dung môi mà tạo thành solvat bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, nước, isopropanol, etanol, metanol, DMSO, etyl axetat, axit axetic và etanolamin. Thuật ngữ "hydrat" đề cập đến phức hợp trong đó phân tử dung môi là nước.

Thuật ngữ "nhóm bảo vệ" đề cập đến phần tử thế mà thường được dùng để phong bế hoặc bảo vệ chức năng cụ thể trong khi phản ứng nhóm chức khác trên hợp chất này. Ví dụ, an "nhóm bảo vệ amin" là phần tử thế được gắn vào nhóm amino mà phong bế hoặc bảo vệ chức năng amino trong hợp chất. Các nhóm bảo vệ amin thích hợp bao gồm axetyl, trifloaxetyl, t-butoxycarbonyl (BOC), benzyloxycarbonyl (CBZ) và 9-flonylmetylenoxycarbonyl (Fmoc). Tương tự, "nhóm bảo vệ hydroxy" đề cập đến phần tử thế của nhóm hydroxy mà phong bế hoặc bảo vệ chức năng hydroxy. Các nhóm bảo vệ thích hợp bao gồm axetyl và silyl. "Nhóm bảo vệ carboxy" đề cập đến phần tử thế của nhóm carboxy mà phong bế hoặc bảo vệ chức năng của carboxy. Các nhóm bảo vệ carboxy thông thường bao gồm phenylsulfonyletyl, xyanoetyl, 2-(trimetylsilyl)etyl, 2-(trimetylsilyl)etoxymetyl, 2-(p-toluensulfonyl)etyl, 2-(p-nitrophenylsulfenyl)etyl, 2-(diphenylphosphino)-etyl, nitroetyl và tương tự. Để mô tả chung hơn về các nhóm bảo vệ và sử dụng chúng, xem T. W. Greene, Protective Groups in Organic Synthesis, John Wiley & Sons, New York, 1991.

"Nhóm rời chuyển" đề cập đến nhóm chức mà có thể được thay thế bởi nhóm nhóm chức khác. Một số nhóm rời chuyển là đã biết trong lĩnh vực này và ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, halogenua (*ví dụ*, clorua, bromua, iodua), metansulfonyl (mesyl), p-toluensulfonyl (tosyl), triflometylsulfonyl (triflat), và triflometylsulfonat.

Các chữ viết tắt

Các hợp phần cầu liên kết:

MC = 6-maleimidocaproyl

Val-Cit hoặc "vc" = valin-xitrulin (dipeptit ví dụ trong cầu liên kết có thể phân tách proteaza)

Xitrulin = axit 2-amino-5-ureido pentanoic

PAB = p-aminobenzyloxycarbonyl (ví dụ về hợp phần cầu liên kết "tự bản thân")

Me-Val-Cit = N-metyl-valin-xitrulin (trong đó peptitt cầu liên kết được gắn kết đã được cải biến để ngăn ngừa sự phân tách của nó bởi cathepsin B)

MC(PEG)6-OH = maleimidocaproyl- polyetylen glycol (có thể được gắn với xystein kháng thể).

Các dược chất độc tế bào:

MMAE = mono-metyl auristatin E (MW 718)

MMAF = biến thể của auristatin E (MMAE) với phenylalanin ở tận cùng C của dược chất (MW 731.5)

MMAF-DMAEA = MMAF với DMAEA (dimetylaminoetylamin) trong liên kết amit với phenylalanin tận cùng C (MW 801.5)

MMAF-TEG = MMAF với tetraetylen glycol được este hoá với phenylalanin

MMAF-NtBu = N-t-butyl, được gắn vào như amit với tận cùng C của MMAF

DM1 = N(2')-deaxetyl-N(2')-(3-mercapto-1-oxopropyl)-maytansin

DM3 = N(2')-deaxetyl-N2-(4-mercapto-1-oxopentyl)-maytansin

DM4 = N(2')-deaxetyl-N2-(4-mercapto-4-metyl-1-oxopentyl)-maytansin

Các chữ viết tắt khác là như sau: AE là auristatin E, Boc là *N*-(*t*-butoxycarbonyl), cit là xitrulin, dap là dolaproin, DCC là 1,3-dixyclohexylcarbodiimit, DCM là dichlorometan, DEA là dietylamin, DEAD là dietylazodicarboxylat, DEPC là dietylphosphorylxyanidat, DIAD là diisopropylazodicarboxylat, DIEA là *N,N*-diisopropyletylamin, dil là dolaisoleuxin, DMA là dimetylaxetamit, DMAP là 4-dimetylaminopyridin, DME là etylenglycol dimetyl ete (hoặc 1,2-dimetoxyetan), DMF là *N,N*-dimetylformamit, DMSO là dimetylsulfoxit, doe là dolaphenin, dov là *N,N*-dimetylvalin, DTNB là 5,5'-dithiobis(axit 2-nitrobenzoic), DTPA là axit dietylentriaminpentaaxetic, DTT là dithiothreitol, EDCI là 1-(3-dimetylaminopropyl)-3-etylcarbodiimit hydroclorua, EEDQ là 2-etoxy-1-etoxycarbonyl-1,2-dihydroquinolin, ES-MS là quang phổ khối phun điện, EtOAc là etyl axetat, Fmoc là *N*-(9-flonylmetoxycarbonyl), gly là glyxin,

HATU là *O*-(7-azabenzotriazol-1-yl)-*N,N,N',N'*-tetrametyluroni hexaflophosphat, HOBt là 1-hydroxybenzotriazol, HPLC là sắc ký lỏng áp xuất cao, ile là isoleuxin, lys là lysin, MeCN (CH_3CN) là axetonitril, MeOH là metanol, Mtr là 4-anisyldiphenylmetyl (hoặc 4-metoxytrityl),nor là (*1S, 2R*)-(+)-norephedrin, PBS là nước muối đệm phosphat (độ pH = 7,4), PEG là polyetylen glycol, Ph là phenyl, Pnp là p-nitrophenyl, MC là 6-maleimidocaproyl, phe là L-phenylalanin, PyBrop là bromo *tris*-pyrrolidino phosphoni hexaflophosphat, SEC là sắc ký ngoại cỡ, Su là sucxinimit, TFA là axit trifloaxetic, TLC là sắc ký lớp mỏng, UV là bức xạ tử ngoại và val là valin.

"Axit amin xystein tự do" đề cập đến gốc axit amin xystein mà đã được tạo ra trong kháng thể ban đầu, có nhóm chức thiol (-SH), và không được cặp đôi như cầu disulfua nội phân tử hoặc trong phân tử.

Thuật ngữ "giá trị phản ứng thiol" là đặc trưng số lượng về khả năng phản ứng của axit amin xystein tự do. Giá trị khả năng phản ứng thiol là phần trăm của axit amin xystein tự do trong kháng thể được xử lý bởi xystein mà phản ứng với chất phản ứng thiol và được biến đổi thành giá trị tối đa là 1. Ví dụ, axit amin xystein tự do trên kháng thể được xử lý bởi xystein mà phản ứng với 100% hiệu xuất với chất phản ứng thiol, như chất phản ứng biotin-maleimit, để tạo thành kháng thể được đánh dấu biotin có giá trị phản ứng thiol là 1,0. Axit amin xystein khác được sinh ra trong kháng thể ban đầu giống nhau hoặc khác nhau mà phản ứng với 80% hiệu xuất với chất phản ứng thiol có giá trị phản ứng thiol là 0,8. Axit amin xystein khác được sinh ra trong kháng thể ban đầu giống nhau hoặc khác nhau mà nằm trong tổng số phản ứng với chất phản ứng thiol có giá trị phản ứng thiol là 0. Xác định giá trị phản ứng thiol của xystein cụ thể có thể được thực hiện bởi thử nghiệm ELISA, quang phổ khối, sắc ký lỏng, tự chụp bằng phóng xạ hoặc các thử nghiệm phân tích định tính khác.

"Kháng thể ban đầu" là kháng thể bao gồm trình tự axit amin từ đó một hoặc nhiều gốc axit amin được thay thế bởi một hoặc nhiều gốc xystein. kháng thể ban đầu có thể bao gồm trình tự nguyên gốc hoặc kiểu dại. kháng thể ban đầu có thể có các cải biến trình tự axit amin tồn tại trước (như thêm, bớt và/hoặc thay thế) so với các dạng gốc khác, kiểu dại hoặc được cải biến của kháng thể. kháng thể ban đầu có thể trực tiếp kháng kháng nguyên đích quan tâm, ví dụ polypeptit quan trọng về mặt sinh học. Các kháng thể trực tiếp kháng kháng nguyên không polypeptit (như các kháng nguyên glycolipit liên quan đến khối u; xem US 5091178) cũng được bao gồm.

Bảng 1

```
/*
 *
 * C-C increased from 12 to 15
 * Z is average of EQ
 * B is average of ND
 * match with stop is _M; stop-stop = 0; J (joker) match = 0
 */
#define  _M      -8      /* value of a match with a stop */

int      _day[26][26] = {
/*    A  B  C  D  E  F  G  H  I  J  K  L  M  N  O  P  Q  R  S  T  U  V  W  X  Y  Z */
/* A */   { 2, 0,-2, 0, 0,-4, 1,-1,-1, 0,-1,-2,-1, 0,_M, 1, 0,-2, 1, 1, 0, 0,-6, 0,-3, 0},
/* B */   { 0, 3,-4, 3, 2,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 0, 0, 0,-2,-5, 0,-3, 1},
/* C */   {-2,-4,15,-5,-5,-4,-3,-3,-2, 0,-5,-6,-5,-4,_M,-3,-5,-4, 0,-2, 0,-2,-8, 0, 0,-5},
/* D */   { 0, 3,-5, 4, 3,-6, 1, 1,-2, 0, 0,-4,-3, 2,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 2},
/* E */   { 0, 2,-5, 3, 4,-5, 0, 1,-2, 0, 0,-3,-2, 1,_M,-1, 2,-1, 0, 0, 0,-2,-7, 0,-4, 3},
/* F */   {-4,-5,-4,-6,-5, 9,-5,-2, 1, 0,-5, 2, 0,-4,_M,-5,-5,-4,-3,-3, 0,-1, 0, 0, 7,-5},
/* G */   { 1, 0,-3, 1, 0,-5, 5,-2,-3, 0,-2,-4,-3, 0,_M,-1,-1,-3, 1, 0, 0,-1,-7, 0,-5, 0},
/* H */   {-1, 1,-3, 1, 1,-2,-2, 6,-2, 0, 0,-2,-2, 2,_M, 0, 3, 2,-1,-1, 0,-2,-3, 0, 0, 2},
/* I */   {-1,-2,-2,-2,-2, 1,-3,-2, 5, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-2,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-5, 0,-1,-2},
/* J */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* K */   {-1, 0,-5, 0, 0,-5,-2, 0,-2, 0, 5,-3, 0, 1,_M,-1, 1, 3, 0, 0, 0,-2,-3, 0,-4, 0},
/* L */   {-2,-3,-6,-4,-3, 2,-4,-2, 2, 0,-3, 6, 4,-3,_M,-3,-2,-3,-3,-1, 0, 2,-2, 0,-1,-2},
/* M */   {-1,-2,-5,-3,-2, 0,-3,-2, 2, 0, 0, 4, 6,-2,_M,-2,-1, 0,-2,-1, 0, 2,-4, 0,-2,-1},
/* N */   { 0, 2,-4, 2, 1,-4, 0, 2,-2, 0, 1,-3,-2, 2,_M,-1, 1, 0, 1, 0, 0,-2,-4, 0,-2, 1},
/* O */   {_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M, 0,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M,_M},
/* P */   { 1,-1,-3,-1,-1,-5,-1, 0,-2, 0,-1,-3,-2,-1,_M, 6, 0, 0, 1, 0, 0,-1,-6, 0,-5, 0},
/* Q */   { 0, 1,-5, 2, 2,-5,-1, 3,-2, 0, 1,-2,-1, 1,_M, 0, 4, 1,-1,-1, 0,-2,-5, 0,-4, 3},
/* R */   {-2, 0,-4,-1,-1,-4,-3, 2,-2, 0, 3,-3, 0, 0,_M, 0, 1, 6, 0,-1, 0,-2, 2, 0,-4, 0},
/* S */   { 1, 0, 0, 0, 0,-3, 1,-1,-1, 0, 0,-3,-2, 1,_M, 1,-1, 0, 2, 1, 0,-1,-2, 0,-3, 0},
/* T */   { 1, 0,-2, 0, 0,-3, 0,-1, 0, 0, 0,-1,-1, 0,_M, 0,-1,-1, 1, 3, 0, 0,-5, 0,-3, 0},
/* U */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* V */   { 0,-2,-2,-2,-2,-1,-1,-2, 4, 0,-2, 2, 2,-2,_M,-1,-2,-2,-1, 0, 0, 4,-6, 0,-2,-2},
/* W */   {-6,-5,-8,-7,-7, 0,-7,-3,-5, 0,-3,-2,-4,-4,_M,-6,-5, 2,-2,-5, 0,-6,17, 0, 0,-6},
/* X */   { 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0,_M, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0, 0},
/* Y */   {-3,-3, 0,-4,-4, 7,-5, 0,-1, 0,-4,-1,-2,-2,_M,-5,-4,-4,-3,-3, 0,-2, 0, 0,10,-4},
/* Z */   { 0, 1,-5, 2, 3,-5, 0, 2,-2, 0, 0,-2,-1, 1,_M, 0, 3, 0, 0, 0, 0,-2,-6, 0,-4, 4}
};
```

Bảng 1 (tiếp theo)

```
/*
 */
#include <stdio.h>
#include <ctype.h>

#define  MAXJMP          16      /* max jumps in a diag */
#define  MAXGAP          24      /* don't continue to penalize gaps larger than this */
#define  JMPS            1024    /* max jmps in an path */
#define  MX              4       /* save if there's at least MX-1 bases since last jmp */

#define  DMAT            3       /* value of matching bases */
#define  DMIS            0       /* penalty for mismatched bases */
#define  DINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  DINS1           1       /* penalty per base */
#define  PINS0           8       /* penalty for a gap */
#define  PINS1           4       /* penalty per residue */

struct jmp {
        short           n[MAXJMP];      /* size of jmp (neg for dely) */
        unsigned short  x[MAXJMP];      /* base no. of jmp in seq x */
};                                      /* limits seq to 2^16 -1 */

struct diag {
        int             score;          /* score at last jmp */
        long            offset;         /* offset of prev block */
        short           ijmp;           /* current jmp index */
        struct jmp      jp;             /* list of jmps */
};

struct path {
        int     spc;            /* number of leading spaces */
        short   n[JMPS];/* size of jmp (gap) */
        int     x[JMPS];/* loc of jmp (last elem before gap) */
};

char            *ofile;                 /* output file name */
char            *namex[2];              /* seq names: getseqs() */
char            *prog;                  /* prog name for err msgs */
char            *seqx[2];               /* seqs: getseqs() */
int             dmax;                   /* best diag: nw() */
int             dmax0;                  /* final diag */
int             dna;                    /* set if dna: main() */
int             endgaps;                /* set if penalizing end gaps */
int             gapx, gapy;             /* total gaps in seqs */
int             len0, len1;             /* seq lens */
int             ngapx, ngapy;           /* total size of gaps */
int             smax;                   /* max score: nw() */
int             *xbm;                   /* bitmap for matching */
long            offset;                 /* current offset in jmp file */
struct  diag    *dx;                    /* holds diagonals */
struct  path    pp[2];                  /* holds path for seqs */

char            *calloc(), *malloc(), *index(), *strcpy();
char            *getseq(), *g_calloc();
```

Bảng 1 (tiếp theo)

```
/* Needleman-Wunsch alignment program
 *
 * usage: progs file1 file2
 *   where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.
 *   The sequences can be in upper- or lower-case an may contain ambiguity
 *   Any lines beginning with ';', '>' or '<' are ignored
 *   Max file length is 65535 (limited by unsigned short x in the jmp struct)
 *   A sequence with 1/3 or more of its elements ACGTU is assumed to be DNA
 *   Output is in the file "align.out"
 *
 * The program may create a tmp file in /tmp to hold info about traceback.
 * Original version developed under BSD 4.3 on a vax 8650
 */
#include "nw.h"
#include "day.h"

static    _dbval[26] = {
        1,14,2,13,0,0,4,11,0,0,12,0,3,15,0,0,0,5,6,8,8,7,9,0,10,0
};

static    _pbval[26] = {
        1, 2|(1<<('D'-'A'))|(1<<('N'-'A')), 4, 8, 16, 32, 64,
        128, 256, 0xFFFFFFF, 1<<10, 1<<11, 1<<12, 1<<13, 1<<14,
        1<<15, 1<<16, 1<<17, 1<<18, 1<<19, 1<<20, 1<<21, 1<<22,
        1<<23, 1<<24, 1<<25|(1<<('E'-'A'))|(1<<('Q'-'A'))
};

main(ac, av)                                                    main
        int     ac;
        char    *av[];
{
        prog = av[0];
        if (ac != 3) {
                fprintf(stderr,"usage: %s file1 file2\n", prog);
                fprintf(stderr,"where file1 and file2 are two dna or two protein sequences.\n");
                fprintf(stderr,"The sequences can be in upper- or lower-case\n");
                fprintf(stderr,"Any lines beginning with ';' or '<' are ignored\n");
                fprintf(stderr,"Output is in the file \"align.out\"\n");
                exit(1);
        }
        namex[0] = av[1];
        namex[1] = av[2];
        seqx[0] = getseq(namex[0], &len0);
        seqx[1] = getseq(namex[1], &len1);
        xbm = (dna)?  dbval :  pbval;

        endgaps = 0;                    /* 1 to penalize endgaps */
        ofile = "align.out";            /* output file */

        nw();                   /* fill in the matrix, get the possible jmps */
        readjmps();             /* get the actual jmps */
        print();                /* print stats, alignment */

        cleanup(0);             /* unlink any tmp files */}
```

Bảng 1 (tiếp theo)

```
/* do the alignment, return best score: main()
 * dna: values in Fitch and Smith, PNAS, 80, 1382-1386, 1983
 * pro: PAM 250 values
 * When scores are equal, we prefer mismatches to any gap, prefer
 * a new gap to extending an ongoing gap, and prefer a gap in seqx
 * to a gap in seq y.
 */
nw()                                                                    nw
{
        char            *px, *py;       /* seqs and ptrs */
        int             *ndely, *dely;  /* keep track of dely */
        int             ndelx, delx;    /* keep track of delx */
        int             *tmp;           /* for swapping row0, row1 */
        int             mis;            /* score for each type */
        int             ins0, ins1;     /* insertion penalties */
        register        id;             /* diagonal index */
        register        ij;             /* jmp index */
        register        *col0, *col1;   /* score for curr, last row */
        register        xx, yy;         /* index into seqs */

        dx = (struct diag *)g_calloc("to get diags", len0+len1+1, sizeof(struct diag));
        ndely = (int *)g_calloc("to get ndely", len1+1, sizeof(int));
        dely = (int *)g_calloc("to get dely", len1+1, sizeof(int));
        col0 = (int *)g_calloc("to get col0", len1+1, sizeof(int));
        col1 = (int *)g_calloc("to get col1", len1+1, sizeof(int));
        ins0 = (dna)? DINS0 : PINS0;
        ins1 = (dna)? DINS1 : PINS1;
        smax = -10000;
        if (endgaps) {
                for (col0[0] = dely[0] = -ins0, yy = 1; yy <= len1; yy++) {
                        col0[yy] = dely[yy] = col0[yy-1] - ins1;
                        ndely[yy] = yy;
                }
                col0[0] = 0;            /* Waterman Bull Math Biol 84 */
        }
        else
                for (yy = 1; yy <= len1; yy++)
                        dely[yy] = -ins0;
        /* fill in match matrix
         */
        for (px = seqx[0], xx = 1; xx <= len0; px++, xx++) {
                /* initialize first entry in col
                 */
                if (endgaps) {
                        if (xx == 1)
                                col1[0] = delx = -(ins0+ins1);
                        else
                                col1[0] = delx = col0[0] - ins1;
                        ndelx = xx;
                }
                else {
                        col1[0] = 0;
                        delx = -ins0;
                        ndelx = 0;
                }
```

Bảng 1 (tiếp theo)

...nw

```
for (py = seqx[1], yy = 1; yy <= len1; py++, yy++) {
        mis = col0[yy-1];
        if (dna)
                mis += (xbm[*px-'A']&xbm[*py-'A'])? DMAT : DMIS;
        else
                mis += _day[*px-'A'][*py-'A'];

        /* update penalty for del in x seq;
         * favor new del over ongong del
         * ignore MAXGAP if weighting endgaps
         */
        if (endgaps || ndely[yy] < MAXGAP) {
                if (col0[yy] - ins0 >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else {
                        dely[yy] -= ins1;
                        ndely[yy]++;
                }
        } else {
                if (col0[yy] - (ins0+ins1) >= dely[yy]) {
                        dely[yy] = col0[yy] - (ins0+ins1);
                        ndely[yy] = 1;
                } else
                        ndely[yy]++;
        }

        /* update penalty for del in y seq;
         * favor new del over ongong del
         */
        if (endgaps || ndelx < MAXGAP) {
                if (col1[yy-1] - ins0 >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else {
                        delx -= ins1;
                        ndelx++;
                }
        } else {
                if (col1[yy-1] - (ins0+ins1) >= delx) {
                        delx = col1[yy-1] - (ins0+ins1);
                        ndelx = 1;
                } else
                        ndelx++;
        }

        /* pick the maximum score; we're favoring
         * mis over any del and delx over dely
         */
```

...nw

```
        id = xx - yy + len1 - 1;
        if (mis >= delx && mis >= dely[yy])
                col1[yy] = mis;
```

Bảng 1 (tiếp theo)

```
                    else if (delx >= dely[yy]) {
                            col1[yy] = delx;
                            ij = dx[id].ijmp;
                            if (dx[id].jp.n[0] && (!dna  || (ndelx >= MAXJMP
                            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                    dx[id].ijmp++;
                                    if (++ij >= MAXJMP) {
                                            writejmps(id);
                                            ij = dx[id].ijmp = 0;
                                            dx[id].offset = offset;
                                            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                    }
                            }
                            dx[id].jp.n[ij] = ndelx;
                            dx[id].jp.x[ij] = xx;
                            dx[id].score = delx;
                    }
                    else {
                            col1[yy] = dely[yy];
                            ij = dx[id].ijmp;
if (dx[id].jp.n[0] && (!dna || (ndely[yy] >= MAXJMP
                            && xx > dx[id].jp.x[ij]+MX) || mis > dx[id].score+DINS0)) {
                                    dx[id].ijmp++;
                                    if (++ij >= MAXJMP) {
                                            writejmps(id);
                                            ij = dx[id].ijmp = 0;
                                            dx[id].offset = offset;
                                            offset += sizeof(struct jmp) + sizeof(offset);
                                    }
                            }
                            dx[id].jp.n[ij] = -ndely[yy];
                            dx[id].jp.x[ij] = xx;
                            dx[id].score = dely[yy];
                    }
                    if (xx == len0 && yy < len1) {
                            /* last col
                             */
                            if (endgaps)
                                    col1[yy] -= ins0+ins1*(len1-yy);
                            if (col1[yy] > smax) {
                                    smax = col1[yy];
                                    dmax = id;
                            }
                    }
            }
            if (endgaps && xx < len0)
                    col1[yy-1] -= ins0+ins1*(len0-xx);
            if (col1[yy-1] > smax) {
                    smax = col1[yy-1];
                    dmax = id;
            }
                                                            tmp = col0; col0 = col1; col1 = tmp;
                                                            }
(void) free((char *)ndely);
(void) free((char *)dely);
(void) free((char *)col0);
                                                    (void) free((char *)col1);                      }
```

Bảng 1 (tiếp theo)

```
/*
 *
 * print() -- only routine visible outside this module
 *
 * static:
 * getmat() -- trace back best path, count matches: print()
 * pr_align() -- print alignment of described in array p[]: print()
 * dumpblock() -- dump a block of lines with numbers, stars: pr_align()
 * nums() -- put out a number line: dumpblock()
 * putline() -- put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 * stars() - -put a line of stars: dumpblock()
 * stripname() -- strip any path and prefix from a seqname
 */

#include "nw.h"

#define SPC     3
#define P_LINE  256     /* maximum output line */
#define P_SPC   3       /* space between name or num and seq */

extern  _day[26][26];
int     olen;           /* set output line length */
FILE    *fx;            /* output file */

print()                                                          print
{
        int     lx, ly, firstgap, lastgap;      /* overlap */

        if ((fx = fopen(ofile, "w")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't write %s\n", prog, ofile);
                cleanup(1);
        }
        fprintf(fx, "<first sequence: %s (length = %d)\n", namex[0], len0);
        fprintf(fx, "<second sequence: %s (length = %d)\n", namex[1], len1);
        olen = 60;
        lx = len0;
        ly = len1;
        firstgap = lastgap = 0;
        if (dmax < len1 - 1) {          /* leading gap in x */
                pp[0].spc = firstgap = len1 - dmax - 1;
                ly -= pp[0].spc;
        }
        else if (dmax > len1 - 1) {     /* leading gap in y */
                pp[1].spc = firstgap = dmax - (len1 - 1);
                lx -= pp[1].spc;
        }
        if (dmax0 < len0 - 1) {         /* trailing gap in x */
                lastgap = len0 - dmax0 -1;
                lx -= lastgap;
        }
        else if (dmax0 > len0 - 1) {    /* trailing gap in y */
                lastgap = dmax0 - (len0 - 1);
                ly -= lastgap;
        }
        getmat(lx, ly, firstgap, lastgap);
                        pr_align();         }
```

Bảng 1 (tiếp theo)

getmat

```
/*
 * trace back the best path, count matches
 */
static
getmat(lx, ly, firstgap, lastgap)
        int     lx, ly;                 /* "core" (minus endgaps) */
        int     firstgap, lastgap;      /* leading trailing overlap */
{
        int             nm, i0, i1, siz0, siz1;
        char            outx[32];
        double          pct;
        register        n0, n1;
        register char   *p0, *p1;
        /* get total matches, score
         */
        i0 = i1 = siz0 = siz1 = 0;
        p0 = seqx[0] + pp[1].spc;
        p1 = seqx[1] + pp[0].spc;
        n0 = pp[1].spc + 1;
        n1 = pp[0].spc + 1;
        nm = 0;
        while ( *p0 && *p1 ) {
                if (siz0) {
                        p1++;
                        n1++;
                        siz0--;
                }
                else if (siz1) {
                        p0++;
                        n0++;
                        siz1--;
                }
                else {
                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A'])
                                nm++;
                        if (n0++ == pp[0].x[i0])
                                siz0 = pp[0].n[i0++];
                        if (n1++ == pp[1].x[i1])
                                siz1 = pp[1].n[i1++];
                        p0++;
                        p1++;
                }
        }

        /* pct homology:
         * if penalizing endgaps, base is the shorter seq
         * else, knock off overhangs and take shorter core
         */
        if (endgaps)
                lx = (len0 < len1)? len0 : len1;
        else
                lx = (lx < ly)? lx : ly;
        pct = 100.*(double)nm/(double)lx;
        fprintf(fx, "\n");
        fprintf(fx, "<%d match%s in an overlap of %d: %.2f percent similarity\n",
                nm, (nm == 1)? "" : "es", lx, pct);
```

Bảng 1 (tiếp theo)

...getmat

```
        fprintf(fx, "<gaps in first sequence: %d", gapx);
        if (gapx) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapx, (dna)? "base":"residue", (ngapx == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        fprintf(fx, ", gaps in second sequence: %d", gapy);
        if (gapy) {
                (void) sprintf(outx, " (%d %s%s)",
                        ngapy, (dna)? "base":"residue", (ngapy == 1)? "":"s");
                fprintf(fx,"%s", outx);
        }
        if (dna)
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (match = %d, mismatch = %d, gap penalty = %d + %d per base)\n",
                smax, DMAT, DMIS, DINS0, DINS1);
        else
                fprintf(fx,
                "\n<score: %d (Dayhoff PAM 250 matrix, gap penalty = %d + %d per residue)\n",
                smax, PINS0, PINS1);
        if (endgaps)
                fprintf(fx,
                "<endgaps penalized. left endgap: %d %s%s, right endgap: %d %s%s\n",
                firstgap, (dna)? "base" : "residue", (firstgap == 1)? "" : "s",
                lastgap, (dna)? "base" : "residue", (lastgap == 1)? "" : "s");
        else
                fprintf(fx, "<endgaps not penalized\n");
}
static          nm;             /* matches in core -- for checking */
static          lmax;           /* lengths of stripped file names */
static          ij[2];          /* jmp index for a path */
static          nc[2];          /* number at start of current line */
static          ni[2];          /* current elem number -- for gapping */
static          siz[2];
static char     *ps[2];         /* ptr to current element */
static char     *po[2];         /* ptr to next output char slot */
static char     out[2][P_LINE]; /* output line */
static char     star[P_LINE];   /* set by stars() */
/*
 * print alignment of described in struct path pp[]
 */
static
```

pr_align

```
pr_align()
{
        int             nn;     /* char count */
        int             more;
        register        i;

        for (i =  0, lmax = 0; i < 2; i++) {
                nn = stripname(namex[i]);
                if (nn > lmax)
                        lmax = nn;
                nc[i] = 1;
                ni[i] = 1;
                siz[i] = ij[i] = 0;
                ps[i] = seqx[i];
                                                po[i] = out[i];         }
```

Bảng 1 (tiếp theo)

...pr_align

```
        for (nn = nm = 0, more = 1; more; ) {
                for (i = more = 0; i < 2; i++) {
                        /*
                         * do we have more of this sequence?
                         */
                        if (!*ps[i])
                                continue;
                        more++;
                        if (pp[i].spc) {        /* leading space */
                                *po[i]++ = ' ';
                                pp[i].spc--;
                        }
                        else if (siz[i]) {      /* in a gap */
                                *po[i]++ = '-';
                                siz[i]--;
                        }
                        else {                  /* we're putting a seq element
                                                 */
                                *po[i] = *ps[i];
                                if (islower(*ps[i]))
                                        *ps[i] = toupper(*ps[i]);
                                po[i]++;
                                ps[i]++;
                                /*
                                 * are we at next gap for this seq?
                                 */
                                if (ni[i] == pp[i].x[ij[i]]) {
                                        /*
                                         * we need to merge all gaps
                                         * at this location
                                         */
                                        siz[i] = pp[i].n[ij[i]++];
                                        while (ni[i] == pp[i].x[ij[i]])
                                                siz[i] += pp[i].n[ij[i]++];
                                }
                                ni[i]++;
                        }
                }
                if (++nn == olen || !more && nn) {
                        dumpblock();
                        for (i = 0; i < 2; i++)
                                po[i] = out[i];
                        nn = 0;
                }
        }
}
/*
 * dump a block of lines, including numbers, stars: pr_align()
 */
static
```

dumpblock

```
dumpblock()
{
        register  i;
        for (i = 0; i < 2; i++)
                *po[i]-- = '\0';
```

Bảng 1 (tiếp theo)

...dumpblock

```
        (void) putc('\n', fx);
        for (i = 0; i < 2; i++) {
                if (*out[i] && (*out[i] != ' ' || *(po[i]) != ' ')) {
                        if (i == 0)
                                nums(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                stars();
                        putline(i);
                        if (i == 0 && *out[1])
                                fprintf(fx, star);
                        if (i == 1)
                                nums(i);
                }
        }
}
/*
 * put out a number line: dumpblock()
 */
static
nums(ix)                                                    nums
        int     ix;     /* index in out[] holding seq line */
{
        char            nline[P_LINE];
        register        i, j;
        register char   *pn, *px, *py;
        for (pn = nline, i = 0; i < lmax+P_SPC; i++, pn++)
                *pn = ' ';
        for (i = nc[ix], py = out[ix]; *py; py++, pn++) {
                if (*py == ' ' || *py == '-')
                        *pn = ' ';
                else {
                        if (i%10 == 0 || (i == 1 && nc[ix] != 1)) {
                                j = (i < 0)? -i : i;
                                for (px = pn; j; j /= 10, px--)
                                        *px = j%10 + '0';
                                if (i < 0)
                                        *px = '-';
                        }
                        else
                                *pn = ' ';
                        i++;
                }
        }
        *pn = '\0';
        nc[ix] = i;
        for (pn = nline; *pn; pn++)
                (void) putc(*pn, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}
/*
 * put out a line (name, [num], seq, [num]): dumpblock()
 */
static
putline(ix)                                                 putline
                                        int     ix;             {
```

Bảng 1 (tiếp theo)

...putline

```
        int             i;
        register char   *px;

        for (px = namex[ix], i = 0; *px && *px != ':'; px++, i++)
                (void) putc(*px, fx);
        for (; i < lmax+P_SPC; i++)
                (void) putc(' ', fx);

        /* these count from 1:
         * ni[] is current element (from 1)
         * nc[] is number at start of current line
         */
        for (px = out[ix]; *px; px++)
                (void) putc(*px&0x7F, fx);
        (void) putc('\n', fx);
}


/*
 * put a line of stars (seqs always in out[0], out[1]): dumpblock()
 */
static
stars()                                                          stars
{
        int             i;
        register char   *p0, *p1, cx, *px;

        if (!*out[0] || (*out[0] == ' ' && *(po[0]) == ' ') ||
           !*out[1] || (*out[1] == ' ' && *(po[1]) == ' '))
                return;
        px = star;
        for (i = lmax+P_SPC; i; i--)
                *px++ = ' ';

        for (p0 = out[0], p1 = out[1]; *p0 && *p1; p0++, p1++) {
                if (isalpha(*p0) && isalpha(*p1)) {

                        if (xbm[*p0-'A']&xbm[*p1-'A']) {
                                cx = '*';
                                nm++;
                        }
                        else if (!dna && _day[*p0-'A'][*p1-'A'] > 0)
                                cx = ':';
                        else
                                cx = ' ';
                }
                else
                        cx = ' ';
                *px++ = cx;
        }
        *px++ = '\n';
        *px = '\0';
}
```

Bảng 1 (tiếp theo)

```
/*
 * strip path or prefix from pn, return len: pr_align()
 */
static
stripname(pn)                                                    stripname
        char    *pn;    /* file name (may be path) */
{
        register char   *px, *py;

        py = 0;
        for (px = pn; *px; px++)
                if (*px == '/')
                        py = px + 1;
        if (py)
                (void) strcpy(pn, py);
        return(strlen(pn));

}
```

Bảng 1 (tiếp theo)

```
/*
 * cleanup() -- cleanup any tmp file
 * getseq() -- read in seq, set dna, len, maxlen
 * g_calloc() -- calloc() with error checkin
 * readjmps() -- get the good jmps, from tmp file if necessary
 * writejmps() -- write a filled array of jmps to a tmp file: nw()
 */
#include "nw.h"
#include <sys/file.h>

char    *jname = "/tmp/homgXXXXXX";             /* tmp file for jmps */
FILE    *fj;
int     cleanup();                              /* cleanup tmp file */
long    lseek();
/*
 * remove any tmp file if we blow
 */
cleanup(i)                                                          cleanup
        int     i;
{
        if (fj)
                (void) unlink(jname);
        exit(i);
}
/*
 * read, return ptr to seq, set dna, len, maxlen
 * skip lines starting with ';', '<', or '>'
 * seq in upper or lower case
 */
char    *
getseq(file, len)                                                   getseq
        char    *file;      /* file name */
        int     *len;       /* seq len */
{
        char            line[1024], *pseq;
        register char   *px, *py;
        int             natgc, tlen;
        FILE            *fp;
        if ((fp = fopen(file,"r")) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: can't read %s\n", prog, file);
                exit(1);
        }
        tlen = natgc = 0;
        while (fgets(line, 1024, fp)) {
                if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
                        continue;
                for (px = line; *px != '\n'; px++)
                        if (isupper(*px) || islower(*px))
                                tlen++;
        }
        if ((pseq = malloc((unsigned)(tlen+6))) == 0) {
                fprintf(stderr,"%s: malloc() failed to get %d bytes for %s\n", prog, tlen+6, file);
                exit(1);
        }
        pseq[0] = pseq[1] = pseq[2] = pseq[3] = '\0';
```

Bảng 1 (tiếp theo)

...getseq

```
	py = pseq + 4;
	*len = tlen;
	rewind(fp);
	while (fgets(line, 1024, fp)) {
		if (*line == ';' || *line == '<' || *line == '>')
			continue;
		for (px = line; *px != '\n'; px++) {
			if (isupper(*px))
				*py++ = *px;
			else if (islower(*px))
				*py++ = toupper(*px);
			if (index("ATGCU",*(py-1)))
				natgc++;
		}
	}
	*py++ = '\0';
	*py = '\0';
	(void) fclose(fp);
	dna = natgc > (tlen/3);
	return(pseq+4);
}
```

g calloc

```
char	*
g_calloc(msg, nx, sz)
	char	*msg;		/* program, calling routine */
	int	nx, sz;		/* number and size of elements */
{
	char		*px, *calloc();
	if ((px = calloc((unsigned)nx, (unsigned)sz)) == 0) {
		if (*msg) {
			fprintf(stderr, "%s: g_calloc() failed %s (n=%d, sz=%d)\n", prog, msg, nx, sz);
			exit(1);
		}
	}
	return(px);
}

/*
 * get final jmps from dx[] or tmp file, set pp[], reset dmax: main()
 */
```

readjmps

```
readjmps()
{
	int		fd = -1;
	int		siz, i0, i1;
	register	i, j, xx;
	if (fj) {
		(void) fclose(fj);
		if ((fd = open(jname, O_RDONLY, 0)) < 0) {
			fprintf(stderr, "%s: can't open() %s\n", prog, jname);
			cleanup(1);
		}
	}
	for (i = i0 = i1 = 0, dmax0 = dmax, xx = len0; ; i++) {
		while (1) {
			for (j = dx[dmax].ijmp; j >= 0 && dx[dmax].jp.x[j] >= xx; j--)
				;
```

Bảng 1 (tiếp theo)

...readjmps

```
                if (j < 0 && dx[dmax].offset && fj) {
                        (void) lseek(fd, dx[dmax].offset, 0);
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].jp, sizeof(struct jmp));
                        (void) read(fd, (char *)&dx[dmax].offset, sizeof(dx[dmax].offset));
                        dx[dmax].ijmp = MAXJMP-1;                                    }
                else
                        break;                  }
        if (i >= JMPS) {
                fprintf(stderr, "%s: too many gaps in alignment\n", prog);
                cleanup(1);
        }
        if (j >= 0) {
                siz = dx[dmax].jp.n[j];
                xx = dx[dmax].jp.x[j];
                dmax += siz;
                if (siz < 0) {                  /* gap in second seq */
                        pp[1].n[i1] = -siz;
                        xx += siz;
                        /* id = xx - yy + len1 - 1                                   */
                        pp[1].x[i1] = xx - dmax + len1 - 1;
                        gapy++;
                        ngapy -= siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (-siz < MAXGAP || endgaps)? -siz : MAXGAP;
                        i1++;
                }
                else if (siz > 0) {     /* gap in first seq */
                        pp[0].n[i0] = siz;
                        pp[0].x[i0] = xx;
                        gapx++;
                        ngapx += siz;
/* ignore MAXGAP when doing endgaps */
                        siz = (siz < MAXGAP || endgaps)? siz : MAXGAP;
                        i0++;
                }
        }
        else
                break;
}
/* reverse the order of jmps    */
for (j = 0, i0--; j < i0; j++, i0--) {
        i = pp[0].n[j]; pp[0].n[j] = pp[0].n[i0]; pp[0].n[i0] = i;
        i = pp[0].x[j]; pp[0].x[j] = pp[0].x[i0]; pp[0].x[i0] = i;
}
for (j = 0, i1--; j < i1; j++, i1--) {
        i = pp[1].n[j]; pp[1].n[j] = pp[1].n[i1]; pp[1].n[i1] = i;
        i = pp[1].x[j]; pp[1].x[j] = pp[1].x[i1]; pp[1].x[i1] = i;
}
if (fd >= 0)
        (void) close(fd);
if (fj) {
        (void) unlink(jname);
        fj = 0;
        offset = 0;
                                }                                       }
```

Bảng 1 (tiếp theo)

writejmps

```
/*
 * write a filled jmp struct offset of the prev one (if any): nw()
 */
writejmps(ix)
        int     ix;
{
        char    *mktemp();

        if (!fj) {
                if (mktemp(jname) < 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't mktemp() %s\n", prog, jname);
                        cleanup(1);
                }
                if ((fj = fopen(jname, "w")) == 0) {
                        fprintf(stderr, "%s: can't write %s\n", prog, jname);
                        exit(1);
                }
        }
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].jp, sizeof(struct jmp), 1, fj);
        (void) fwrite((char *)&dx[ix].offset, sizeof(dx[ix].offset), 1, fj);
}
```

III. Chế phẩm và phương pháp theo sáng chế

Sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b hoặc các mảnh chức năng của chúng và phương pháp sử dụng chúng để điều trị khối u tế bào tạo huyết.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể mà gắn kết, tốt hơn là đặc hiệu, với polypeptit bất kỳ được mô tả trên đây hoặc dưới đây. Tuỳ ý, kháng thể là kháng thể đơn dòng, mảnh kháng thể, bao gồm Fab, Fab', $F(ab')_2$, và mảnh Fv, diabody, kháng thể miền đơn, kháng thể khảm, kháng thể được làm thích hợp với người, kháng thể chuỗi đơn hoặc kháng thể mà ức chế cạnh tranh gắn kết của kháng kháng CD79b polypeptit với epitop kháng nguyên tương ứng của nó. kháng thể theo sáng chế có thể tuỳ ý được liên hợp với chất ức chế phát triển hoặc chất độc tế bào như độc tố, bao gồm, ví dụ, auristatin, maytansinoit, dẫn xuất dolostatin hoặc calicheamixin, chất kháng sinh, chất đồng vị phóng xạ, enzym phân cắt liên kết giữa các nucleotit, hoặc tương tự. kháng thể theo sáng chế có thể tuỳ ý được tạo ra trong các tế bào CHO hoặc tế bào vi khuẩn và tốt hơn là gây chết tế bào mà chúng gắn kết. Đối với mục đích phát hiện, kháng thể theo sáng chế có thể được đánh dấu có thể phát hiện, được gắn vào chất trợ rắn hoặc tương tự.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực hoá trị một của kháng thể kháng CD79b (ví dụ ái lực của kháng thể như mảnh Fab kháng CD79b) về căn bản là giống với ái lực hoá trị một của kháng thể của chuột (ví dụ ái lực của kháng thể của chuột như mảnh Fab kháng CD79b) hoặc kháng thể khảm (ví dụ ái lực của kháng thể khảm như mảnh Fab kháng CD79b), bao gồm, bao gồm hoặc về căn bản là bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được mô tả trong các Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực hoá trị một của kháng thể kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như mảnh Fab kháng CD79b) là thấp hơn, ví dụ ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 hoặc 60 lần thấp hơn, so với ái lực hoá trị một của kháng thể của chuột (ví dụ, ái lực của kháng thể của chuột như mảnh Fab kháng CD79b) hoặc kháng thể khảm (ví dụ ái lực của kháng thể khảm như mảnh Fab kháng CD79b), bao gồm hoặc về căn bản là bao gồm trình tự

miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được mô tả trong các Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực hoá trị một của kháng thể kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như mảnh Fab kháng CD79b) là lớn hơn, ví dụ ít nhất là khoảng 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 lần lớn hơn, so với ái lực hoá trị một của kháng thể của chuột (ví dụ, ái lực của kháng thể của chuột như mảnh Fab kháng CD79b) hoặc kháng thể khảm (ví dụ ái lực của kháng thể khảm như mảnh Fab kháng CD79b), bao gồm hoặc về căn bản là bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được mô tả trong Các Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và Các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) về căn bản là giống với ái lực của kháng thể của chuột (ví dụ ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) hoặc kháng thể khảm (ví dụ ái lực của kháng thể khảm như mảnh Fab kháng CD79b) ở dạng hoá trị hai của nó, bao gồm hoặc về căn bản là bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được mô tả trong các Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là thấp hơn, ví dụ ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16, 17, 18, 19, 20, 25, 30, 35, 40, 45, 50, 55 hoặc 60 lần thấp hơn so với ái lực của kháng thể của chuột (ví dụ ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) hoặc kháng thể khảm (ví dụ ái lực của kháng thể khảm như mảnh IgG kháng CD79b) ở dạng hoá trị hai của nó, bao gồm hoặc về căn bản là bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được mô tả trong các Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là lớn hơn, ví dụ ít nhất là 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 lớn hơn, so với ái lực của kháng thể của chuột (ví dụ ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) hoặc kháng thể khảm (ví dụ ái lực của kháng thể khảm như

mảnh IgG kháng CD79b) ở dạng hoá trị hai của nó, bao gồm hoặc về căn bản là bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ và chuỗi nặng như được mô tả trong các Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14).

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,4 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,4 nM +/- 0,04.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,3 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,32 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,36 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,4 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,44 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,48 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,5 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,3 nM đến 0,5 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được

làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,32 nM đến 0,48 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,36 nM đến 0,44 nM.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,2 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,2 nM +/- 0,02.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,1 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,12 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,14 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,16 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,18 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,2 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,22 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b

được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0.24 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,26 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,28 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,30 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,1 nM đến 0,3 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,12 nM đến 0,28 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,14 nM đến 0,26 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,16 nM đến 0,24 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,18 nM đến 0,22 nM.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,5 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,5 nM +/- 0,1.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai của nó kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,4nM hoặc tốt hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai của nó kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,5nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,6 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là 0,7 nM hoặc lớn hơn. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,3 nM đến 0,7 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,4 nM đến 0,6 nM. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người trong đó ái lực của kháng thể ở dạng hoá trị hai kháng CD79b (ví dụ, ái lực của kháng thể như IgG kháng CD79b) là nằm trong khoảng từ 0,5 nM đến 0,55 nM.

Theo một khía cạnh, ái lực hoá trị một của kháng thể của chuột kháng CD79b về căn bản là giống với ái lực gắn kết của mảnh Fab bao gồm trình tự miền biến đổi của SEQ ID NO: 10 (các Fig. 7A-B) và SEQ ID NO: 14 (các Fig. 8A-B). Theo khía cạnh khác, ái lực hoá trị một của kháng thể của chuột kháng CD79b về căn bản là giống với ái lực gắn kết của mảnh Fab bao gồm trình tự miền biến đổi của kháng thể được sinh ra từ thể lai được lưu giữ với ATCC như HB11413 ngày 20/7/1993 hoặc kháng thể khảm bao gồm miền biến đổi từ kháng thể được sinh ra từ các thể lai được lưu giữ với ATCC như HB11413 ngày 20/7/1993.

Như đã biết trong lĩnh vực này, ái lực gắn kết của phối tử với thụ thể của nó có thể được xác định bằng cách sử dụng nhiều thử nghiệm bất kỳ và được biểu hiện theo các thuật ngữ nhiều giá trị định lượng. Do đó, theo một phương án, ái lực gắn kết được

biểu hiện như giá trị Kd và đề cập đến ái lực gắn kết nội tại (ví dụ, với các tác động ái lực được giảm thiểu). Thông thường và tốt hơn là, ái lực gắn kết được xác định *in vitro*, ở bộ không có tế bào hoặc liên quan đến tế bào. Như được mô tả chi tiết hơn ở đây, sự khác nhau gấp nhiều lần trong ái lực gắn kết có thể được xác định theo tỷ lệ của giá trị ái lực gắn kết hoá trị một của kháng thể được làm thích hợp với người (ví dụ, ở dạng Fab) và giá trị ái lực gắn kết hoá trị một của kháng thể tham khảo/so sánh (ví dụ, ở dạng Fab) (ví dụ, kháng thể của chuột có trình tự vùng siêu biến cho), trong đó các giá trị ái lực gắn kết được xác định dưới các điều kiện thử nghiệm tương tự. Do đó, theo một phương án, sự khác nhau nhiều lần theo ái lực gắn kết được xác định là tỷ lệ của giá trị Kd của kháng thể được làm thích hợp với người ở dạng Fab và kháng thể Fab tham khảo/so sánh. Ví dụ, theo một phương án, nếu kháng thể theo sáng chế (A) có ái lực là "thấp hơn 3 lần" so với ái lực của kháng thể tham khảo (M), sau đó nếu giá trị Kd đối với A là 3x, giá trị Kd của M là 1x, và tỷ lệ của Kd của A với Kd của M là 3:1. Ngược lại, theo một phương án, nếu kháng thể theo sáng chế (C) có ái lực là "lớn hơn gấp 3 lần" so với ái lực của kháng thể tham khảo (R), sau đó, nếu giá trị Kd đối với C là 1x, giá trị Kd của R là 3x, và tỷ lệ Kd của C với Kd của R là 1:3. Nhiều thử nghiệm bất kỳ đã biết trong lĩnh vực này, bao gồm các thử nghiệm được mô tả ở đây, có thể được sử dụng để thu được các xác định ái lực gắn kết, bao gồm, ví dụ, Biacore, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) và ELISA.

Theo một khía cạnh, kháng thể gắn kết với CD79b được đề xuất, trong đó kháng thể bao gồm:

(a) ít nhất là một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự A1-A15, trong đó A1-A15 là KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự B1-B7, trong đó B1-B7 là AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự C1-C9, trong đó C1-C9 là QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1 bao gồm trình tự D1-D10, trong đó D1-D10 là GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2 bao gồm trình tự E1-E18, trong đó E1-E18 là GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) và

(vi) HVR-H3 bao gồm trình tự F1-F10, trong đó F1-F10 là TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136).

Theo một phương án, HVR-L1 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 131. Theo một phương án, HVR-L2 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 132. Theo một phương án, HVR-L3 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 133. Theo một phương án, HVR-H1 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 134. Theo một phương án, HVR-H2 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 135. Theo một phương án, HVR-H3 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 136. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự này (kết hợp như được mô tả ở đây) là được làm thích hợp với người hoặc của người.

Theo một khía cạnh, kháng thể gắn kết với CD79b được đề xuất, trong đó kháng thể bao gồm:

(a) ít nhất là một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR được chọn từ nhóm bao gồm:

(i) HVR-L1 bao gồm trình tự A1-A15, trong đó A1-A15 là KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131)

(ii) HVR-L2 bao gồm trình tự B1-B7, trong đó B1-B7 là AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(iii) HVR-L3 bao gồm trình tự C1-C9, trong đó C1-C9 là QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(iv) HVR-H1 bao gồm trình tự D1-D10, trong đó D1-D10 là GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(v) HVR-H2 bao gồm trình tự E1-E18, trong đó E1-E18 là GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) và

(vi) HVR-H3 bao gồm trình tự F1-F10, trong đó F1-F10 là TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136); và

(b) ít nhất là một biến thể HVR trong đó biến thể trình tự HVR bao gồm cải biến của ít nhất là một gốc của trình tự được mô tả trong SEQ ID NOs: 131, 132, 133, 134, 135 hoặc 136. Theo một phương án, HVR-L1 của kháng thể theo sáng chế bao

gồm trình tự của SEQ ID NO: 131. Theo một phương án, HVR-L2 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 132. Theo một phương án, HVR-L3 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 133. Theo một phương án, HVR-H1 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 134. Theo một phương án, HVR-H2 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 135. Theo một phương án, HVR-H3 của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự của SEQ ID NO: 136. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm các trình tự này (kết hợp với như được mô tả ở đây) là được làm thích hợp với người hoặc của người.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm một, hai, ba, bốn, năm hoặc sáu HVR, trong đó mỗi HVR bao gồm, bao gồm hoặc về căn bản là bao gồm trình tự được chọn từ nhóm bao gồm SEQ ID NOs: 131, 132, 133, 134, 135, và 136, và trong đó SEQ ID NO: 131 tương ứng với HVR-L1, SEQ ID NO: 132 tương ứng với HVR-L2, SEQ ID NO: 133 tương ứng với HVR-L3, SEQ ID NO: 134 tương ứng với HVR-H1, SEQ ID NO: 135 tương ứng với HVR-H2, và SEQ ID NO: 136 tương ứng với HVR-H3. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3, trong đó mỗi kháng thể, theo thứ tự, bao gồm SEQ ID NO: 131, 132, 133, 134, 135 và 136.

Biến thể HVR trong kháng thể theo sáng chế có thể có các cải biến của một hoặc nhiều gốc trong HVR. Theo một phương án, biến thể HVR-L1 bao gồm một thay thế ở các vị trí sau đây: A4 (K), A9 (E hoặc S) và A10 (A hoặc S). Theo một phương án, biến thể HVR-L2 bao gồm 1-5 (1, 2, 3, 4, hoặc 5) thay thế ở một vị trí bất kỳ hoặc kết hợp các vị trí sau đây: B2 (S hoặc G), B3 (R hoặc G), B4 (K, R, Y, I, H hoặc Q), B5 (R), B6 (G, K, A, R, S hoặc L) và B7 (R, N, T hoặc G). Theo một phương án, biến thể HVR-L3 bao gồm 1-4 (1, 2, 3 hoặc 4) thay thế ở vị trí bất kỳ hoặc kết hợp các vị trí sau đây: C1 (N hoặc D), C2 (N hoặc P), C3 (D hoặc R), C5 (S, K, A, Q, D, L hoặc G), C6 (A, E hoặc N), C7 (A), C8 (R) và C9 (N). Theo một phương án, biến thể HVR-H1 bao gồm 1-7 (1, 2, 3, 4, 5, 6 hoặc 7) thay thế ở vị trí bất kỳ hoặc kết hợp các vị trí sau đây: D1 (P), D2 (F), D3 (P, S, Y, G hoặc N), D4 (L hoặc V), D5 (T, R, N, K, C, G hoặc P), D6 (R, T, K hoặc G), D8 (F), D9 (V hoặc L) và D10 (S, Q, N hoặc D). Theo một phương án, biến thể HVR-H3 bao gồm 1-3 (1, 2 hoặc 3) thay thế ở vị trí bất kỳ hoặc kết hợp các vị trí sau đây: F4 (R hoặc I), F6 (I hoặc F), F7 (K, C, R, V hoặc F),

F8 (L), và F9 (S). (Các) chữ cái trong dấu ngoặc đơn sau mỗi vị trí cho biết thay thế minh hoạ (nghĩa là, thay thế) axit amin; như là bằng chứng đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, tính thích hợp của các axit amin khác như các axit amin thay thế theo nội dung được mô tả ở đây có thể được thử nghiệm thông thường bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này và/hoặc được mô tả ở đây. Theo một phương án, A9 trong biến thể HVR-L1 là E. Theo một phương án, F6 trong biến thể HVR-H3 là I. Theo một phương án, F7 trong biến thể HVR-H3 là R. Theo một phương án, F8 trong biến thể HVR-H3 là L. Theo một phương án kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-H3 trong đó F6 là I, F7 là R và F8 là L. Theo một phương án kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-L1 trong đó A9 là E và biến thể HVR-H3 trong đó F6 là I, F7 là R và F8 là L. Theo một phương án, A9 trong biến thể HVR-L1 là S. Theo một phương án kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-L1 trong đó A9 là S và biến thể HVR-H3 trong đó F6 là I, F7 là R và F8 là L.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-L1 trong đó A4 là K. Theo một số phương án, biến thể HVR-L1 này bao gồm HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 trong đó mỗi biến thể bao gồm, theo thứ tự, trình tự được mô tả trong SEQ ID NOs: 132, 133, 134, 135 và 136. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-L1 này còn bao gồm biến thể HVR-L1 trong đó A9 là E hoặc S và/hoặc A10 là A hoặc S. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-L1 này còn bao gồm biến thể HVR-L3 trong đó C6 là E hoặc N và/hoặc C7 là A. Theo một số phương án, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng bao gồm thay thế ở vị trí 71, 73 và/hoặc 78. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí 71 là A, 73 là T và/hoặc 78 là A. Theo một phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một số phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người bao gồm thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 và/hoặc 80. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người) 48 là I, 67 là A, 69 là F, 71 là A, 73 là T, 75 là S, 78 là

A và hoặc 80 là M. Theo một số phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-L2 trong đó B3 là R, B4 là K, B6 là G và B7 là R. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-L2 trong đó B3 là R, B4 là Y, B6 là K và B7 là R. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-L2 trong đó B3 là R B4 là K và B6 là G. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-L2 này còn bao gồm HVR-L1, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 trong đó mỗi biến thể bao gồm, theo thứ tự, trình tự được mô tả trong SEQ ID NOs: 131, 133, 134, 135 và 136. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-L2 này còn bao gồm biến thể HVR-L1 trong đó A9 là E hoặc S và/hoặc A10 là A hoặc S. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-L2 này còn bao gồm biến thể HVR-L3 trong đó C6 là E hoặc N và/hoặc C7 là A. Theo một số phương án, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng bao gồm thay thế ở vị trí 71, 73 và/hoặc 78. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí 71 là A, 73 là T và/hoặc 78 là A. Theo một phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một số phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người bao gồm thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 và/hoặc 80. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người) 48 là I, 67 là A, 69 là F, 71 là A, 73 là T, 75 là S, 78 là A và hoặc 80 là M. Theo một số phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các

kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-L3 trong đó C5 là K. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-L3 trong đó C5 là S. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-L3 này còn bao gồm HVR-L1, HVR-L2, HVR-H1, HVR-H2 và HVR-H3 trong đó mỗi biến thể bao gồm, theo thứ tự, trình tự được mô tả trong SEQ ID NOs: 131, 132, 134, 135 và 136. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-L3 này còn bao gồm biến thể HVR-L1 trong đó A9 là E hoặc S và/hoặc A10 là A hoặc S. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-L3 này còn bao gồm biến thể HVR-L3 trong đó C6 là E hoặc N và/hoặc C7 là A. Theo một số phương án, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng bao gồm thay thế ở vị trí 71, 73 và/hoặc 78. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí 71 là A, 73 là T và/hoặc 78 là A. Theo một phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một số phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người bao gồm thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 và/hoặc 80. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người) 48 là I, 67 là A, 69 là F, 71 là A, 73 là T, 75 là S, 78 là A và hoặc 80 là M. Theo một số phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-H1 trong đó D3 là P, D5 là T, D6 là R và D10 là N. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-H1 trong đó D3 là P, D5 là N, D6 là R và D10 là N. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-H1 này còn bao gồm HVR-L1, HVR-L2,

HVR-L3, HVR-H2 và HVR-H3 trong đó, mỗi biến thể bao gồm, theo thứ tự, trình tự được mô tả trong SEQ ID NOs: 131, 132, 133, 135 và 136. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-H1 này còn bao gồm biến thể HVR-L1 trong đó A9 là E hoặc S và/hoặc A10 là A hoặc S. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-H1 này còn bao gồm biến thể HVR-L3 trong đó C6 là E hoặc N và/hoặc C7 là A. Theo một số phương án, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng bao gồm thay thế ở vị trí 71, 73 và/hoặc 78. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí 71 là A, 73 là T và/hoặc 78 là A. Theo một phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một số phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người bao gồm thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 và/hoặc 80. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người) 48 là I, 67 là A, 69 là F, 71 là A, 73 là T, 75 là S, 78 là A và hoặc 80 là M. Theo một số phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F.

Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-H3 trong đó F6 là I và F8 là L. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm biến thể HVR-H3 trong đó F6 là I, F7 là R và F8 là L. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-H3 này còn bao gồm HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1 và HVR-H2 trong đó mỗi biến thể bao gồm, theo thứ tự, trình tự được mô tả trong SEQ ID NOs: 131, 132, 133, 134 và 135. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-H3 này còn bao gồm biến thể HVR-L1 trong đó A9 là E hoặc S và/hoặc A10 là A hoặc S. Theo một số phương án, biến thể kháng thể HVR-H3 này còn bao gồm biến thể HVR-L3 trong đó C6 là E hoặc N và/hoặc C7 là A. Theo một số phương án, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người. Theo

một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người bao gồm thay thế ở vị trí 71, 73 và/hoặc 78. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người) 71 là A, 73 là T và/hoặc 78 là A. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người bao gồm thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73 và/hoặc 78. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người) 48 là I, 67 là A, 69 là F, 71 là A, 73 là T và/hoặc 78 là A. Theo một phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một số phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người bao gồm thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 và/hoặc 80. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III của người) 48 là I, 67 là A, 69 là F, 71 là A, 73 là T, 75 là S, 78 là A và hoặc 80 là M. Theo một số phương án về các kháng thể này, các kháng thể này còn bao gồm trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người. Theo một phương án về các kháng thể này, trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một số phương án về các kháng thể này, vị trí (của trình tự khung liên ứng chuỗi nhẹ I của người) 4 là L và/hoặc 47 là F.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm một, hai, ba, bốn, năm hoặc tất cả trình tự HVR được mô tả trong Fig. 9 (SEQ ID NOs: 17-21) và/hoặc Fig. 10 (SEQ ID NOs: 22-106).

Chất điều trị để sử dụng ở đối tượng chủ tốt hơn là tạo ra từ ít đến không có đáp ứng miễn dịch đối với chất này ở đối tượng này. Theo một phương án, sáng chế đề xuất chất này. Ví dụ, theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể được làm thích hợp với người mà tạo ra và/hoặc được mong đợi để tạo ra đáp ứng kháng nguyên của người kháng chuột (HAMA) ở mức về căn bản là giảm so với kháng thể bao gồm trình tự SEQ ID NO: 10 & 14 ở đối tượng chủ. Theo ví dụ khác, sáng chế đề xuất kháng thể được làm thích hợp với người mà tạo ra và/hoặc được mong đợi tạo ra đáp ứng kháng thể tối thiểu hoặc không phải của người kháng chuột (HAMA). Theo một ví dụ, kháng

thể theo sáng chế tạo ra đáp ứng kháng thể kháng chuột mà là ở hoặc ít hơn mức có thể chấp nhận về mặt lâm sàng.

Kháng thể được làm thích hợp với người theo sáng chế có thể bao gồm một hoặc nhiều trình tự vùng không siêu biến của người hoặc liên ứng của người (ví dụ, khung) ở miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của nó. Theo một số phương án, một hoặc nhiều cải biến bổ sung có mặt trong các trình tự vùng không siêu biến của người và/hoặc liên ứng của người. Theo một phương án, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự khung liên ứng của người, mà theo một phương án là trình tự khung liên ứng phân nhóm III. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự khung liên ứng biến thể phân nhóm III được cải biến ít nhất là một vị trí axit amin. Ví dụ, theo một phương án, trình tự khung liên ứng phân nhóm III biến thể có thể bao gồm thay thế ở một hoặc nhiều vị trí 71, 73 và/hoặc 78. Theo một phương án, thay thế này là R71A, N73T và/hoặc L78A, theo kết hợp bất kỳ của chúng. Ví dụ, theo một phương án, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III biến thể bao gồm thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73 và/hoặc 78. Theo một phương án, thay thế này là V48I, F67A, I69F, R71A, N73T và/hoặc L78A. Ví dụ, theo một phương án, trình tự khung liên ứng chuỗi nặng phân nhóm III biến thể bao gồm thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 và/hoặc 80. Theo một phương án, thay thế này là V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A và/hoặc L80M. Theo một phương án, miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự khung liên ứng của người, mà theo một phương án là trình tự khung liên ứng I. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự khung liên ứng biến thể I được cải biến ít nhất là một vị trí axit amin. Ví dụ, theo một phương án, trình tự khung liên ứng biến thể I có thể bao gồm thay thế ở vị trí 4. Theo một phương án, thay thế này là M4L. Ví dụ, theo một phương án, trìnhtwj khung liên ứng biến thể I có thể bao gồm thay thế ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một phương án, thay thế này là M4L và/hoặc L47F.

Như đã biết trong lĩnh vực này và như được mô tả chi tiết hơn dưới đây, vị trí axit amin/mô tả giới hạn vùng siêu biến của kháng thể có thể thay đổi, phụ thuộc vào nội dung và định nghĩa khác nhau đã biết trong lĩnh vực này (như được mô tả dưới đây). Một số vị trí trong miền biến đổi có thể là các vị trí siêu biến lai trong đó các vị trí này dường như có thể là nằm trong vùng siêu biến dưới một bộ tiêu chuẩn trong khi dường như là bên ngoài vùng siêu biến dưới bộ tiêu chuẩn khác nhau. Một hoặc nhiều

vị trí này cũng có thể được tìm thấy ở các vùng siêu biến kéo dài (như được xác định dưới đây). Sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm các cải biến ở các vị trí siêu biến lai này. Theo một phương án, các vị trí siêu biến này bao gồm một hoặc nhiều vị trí 26-30, 33-35B, 47-49, 57-65, 93, 94 và 101-102 ở miền biến đổi chuỗi nặng. Theo một phương án, các vị trí siêu biến lai này bao gồm một hoặc nhiều vị trí 24-29, 35-36, 46-49, 56 và 97 ở miền biến đổi chuỗi nhẹ. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự khung liên ứng phân nhóm biến thể của người ở một hoặc nhiều vị trí siêu biến lai.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự khung liên ứng phân nhóm III biến thể của người được cải biến ở một hoặc nhiều vị trí 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 và 101. Theo một phương án, kháng thể bao gồm cải biến G26P. Theo một phương án, kháng thể bao gồm cải biến F27Y. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế T28P, S, Y, G hoặc N. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế F29L hoặc F29V. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế S30T, R, N, K, C, G hoặc P. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế A33W hoặc A33F. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế M34I, V hoặc L. Theo một phương án S35E, Q, N hoặc D. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế V48I. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế S49G. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế Y58N. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế A60N. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế D61E. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế S62I. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế V63F. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế A93T. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế D101S.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự khung liên ứng phân nhóm I kappa biến thể của người được cải biến ở một hoặc nhiều vị trí 24, 27-29, 56 và 97. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế R24K. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế Q27K. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế S28D hoặc E. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế I29G, A hoặc S. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế S56R, N, T hoặc G. Theo một phương án, kháng thể bao gồm thay thế T97N.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự khung liên ứng phân nhóm III biến thể của người được cải biến

ở 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, 10, 11, 12, 13, 14, 15, 16 hoặc tất cả vị trí 26-30, 33-35, 48-49, 58, 60-63, 93 và 101. Theo một phương án, cải biến được chọn từ nhóm bao gồm G26P, F27Y, T28P (S, Y, G hoặc N), F29L (V), S30T (R, N, K, C, G hoặc P), A33W (F), M34I (V hoặc L), S35E (Q, N hoặc D), V48I, S49G, Y58N, A60N, D61E, S62I, V63F, A93T và D101S. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự khung liên ứng phân nhóm III biến thể được cải biến ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73, 75, 78 và/hoặc 80. Theo một phương án, cải biến này là V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, K75S, L78A và/hoặc L80M.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự khung liên ứng phân nhóm I kappa biến thể của người được cải biến ở 1, 2, 3, 4, 5 hoặc tất cả vị trí 24, 27-29, 56 và 97. Theo một phương án, cải biến được chọn từ nhóm bao gồm R24K, Q27K, S28D (E), I29G (A hoặc S), S56R (N, T hoặc G) và T97N. Theo một số phương án của sáng chế, kháng thể theo sáng chế bao gồm trình tự khung lilên ứng phân nhóm I biến thể được cải biến ở vị trí 4 và/hoặc 47. Theo một phương án, thay thế này là M4L và/hoặc L47F.

Kháng thể theo sáng chế có thể bao gồm các trình tự khung chuỗi nhẹ thích hợp của người hoặc liên ứng của người, với điều kiện kháng thể này thể hiện các đặc tính sinh học mong muốn (ví dụ, ái lực gắn kết mong muốn). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm ít nhất là một phần (hoặc tất cả) của trình tự khung của chuỗi nhẹ của người. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm ít nhất là một phần (hoặc tất cả) của trình tự khung liên ứng phân nhóm I của người.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ bao gồm trình tự khung được mô tả trong SEQ ID NO: 9 (các Fig. 7A-B) và/hoặc 13 (các Fig. 8A-B).

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế là kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người được liên hợp với chất độc tế bào ức chế tiến triển khối u ở mảnh ghép khác loài.

Theo một khía cạnh, kháng thể được làm thích hợp với người và kháng thể khảm có hoá trị một. Theo một phương án, kháng thể được làm thích hợp với người và kháng thể khảm bao gồm vùng đơn Fab được liên kết vuới vùng Fc. Theo một phương án, kháng thể khảm tham khảo bao gồm trình tự miền biến đổi được mô tả trong các

Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14) được liên kết với vùng Fc của người. Theo một phương án, vùng Fc của người là vùng của IgG (ví dụ, IgG1, 2, 3 hoặc 4).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 164-166). Theo một phương án, miền biến đổi bao gồm FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC trình tự được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 160-163). Theo một phương án, kháng thể bao gồm CH1 và/hoặc Fc trình tự được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 167 và/hoặc 168). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 15, SEQ ID NO: 164-166), và trình tự FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC (Fig. 15, SEQ ID NO: 160-163). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 15, SEQ ID NO: 164-166), và trình tự CH1 và/hoặc Fc được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 167 và/hoặc 168). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 15, SEQ ID NO: 164-166), và trình tự FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC (Fig. 15, SEQ ID NO: 160-163), và CH1 và/hoặc Fc (Fig. 15, SEQ ID NO: 167 và/hoặc 168).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC trình tự được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 156-158). Theo một phương án, miền biến đổi bao gồm FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC trình tự được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 152-155). Theo một phương án, kháng thể bao gồm CL1 trình tự được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 159). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO: 156-158), và trình tự FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC (SEQ ID NO: 152-155) được mô tả trong Fig. 15. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO:156-158), và trình tự CL1 (SEQ ID NO: 159) được mô tả trong Fig. 15. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO:

156-158), và FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC (SEQ ID NO: 152-155) trình tự được mô tả trong Fig. 15, và trình tự CL1 được mô tả trong Fig. 15 (SEQ ID NO: 159).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC trình tự được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 183-185). Theo một phương án, miền biến đổi bao gồm FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC trình tự được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 179-182). Theo một phương án, kháng thể bao gồm CH1 và/hoặc Fc trình tự được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 186 và/hoặc 187). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 16, SEQ ID NO: 183-185), và trình tự FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC (Fig. 16, SEQ ID NO: 179-182). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 16, SEQ ID NO: 183-185), và CH1 và/hoặc Fc trình tự được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 186 và/hoặc 187). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 16, SEQ ID NO: 183-185), và trình tự FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC (Fig. 16, SEQ ID NO: 179-182), và CH1 và/hoặc Fc (Fig. 16, SEQ ID NO: 186 và/hoặc 187).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC trình tự được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 175-177). Theo một phương án, miền biến đổi bao gồm FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC trình tự được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 171-174). Theo một phương án, kháng thể bao gồm CL1 trình tự được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 178). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO: 175-177), và trình tự FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC (SEQ ID NO: 171-174) được mô tả trong Fig. 16. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO: 175-177), và trình tự CL1 (SEQ ID NO: 178) được mô tả trong Fig. 16. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO:

175-177), và FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC (SEQ ID NO: 171-174) trình tự được mô tả trong Fig. 16, và trình tự CL1 được mô tả trong Fig. 16 (SEQ ID NO: 178).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 202-204). Theo một phương án, miền biến đổi bao gồm FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC trình tự được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 198-201). Theo một phương án, kháng thể bao gồm CH1 và/hoặc Fc trình tự được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 205 và/hoặc 206). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 17, SEQ ID NO: 202-204), và trình tự FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC (Fig. 17, SEQ ID NO: 198-201). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 17, SEQ ID NO: 202-204), và trình tự CH1 và/hoặc Fc được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 205 và/hoặc 206). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 17, SEQ ID NO: 202-204), và trình tự FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC (Fig. 17, SEQ ID NO: 198-201), và CH1 và/hoặc Fc (Fig. 17, SEQ ID NO: 205 và/hoặc 206).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC trình tự được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 194-196). Theo một phương án, miền biến đổi bao gồm FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC trình tự được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 190-193). Theo một phương án, kháng thể bao gồm CL1 trình tự được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 197). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO: 194-196), và trình tự FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC (SEQ ID NO: 190-193) được mô tả trong Fig. 17. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO: 194-196), và trình tự CL1 (SEQ ID NO: 197) được mô tả trong Fig. 17. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO:

194-196), và trình tự FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC (SEQ ID NO: 190-193) được mô tả trong Fig. 17, và CL1 trình tự được mô tả trong Fig. 17 (SEQ ID NO: 197).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC trình tự được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 221-223). Theo một phương án, miền biến đổi bao gồm FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC trình tự được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 217-220). Theo một phương án, kháng thể bao gồm CH1 và/hoặc Fc trình tự được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 224 và/hoặc 225). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 18, SEQ ID NO: 221-223), và trình tự FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC (Fig. 18, SEQ ID NO: 217-220). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 18, SEQ ID NO: 221-223), và trình tự CH1 và/hoặc Fc được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 224 và/hoặc 225) Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nặng bao gồm trình tự HVR1-HC, HVR2-HC và/hoặc HVR3-HC (Fig. 18, SEQ ID NO: 221-223), và trình tự FR1-HC, FR2-HC, FR3-HC và/hoặc FR4-HC (Fig. 18, SEQ ID NO: 217-220), và CH1 và/hoặc Fc (Fig. 18, SEQ ID NO: 224 và/hoặc 225).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC trình tự được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 213-215). Theo một phương án, miền biến đổi bao gồm FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC trình tự được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 209-212). Theo một phương án, kháng thể bao gồm CL1 trình tự được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 216). Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO: 213-215), và trình tự FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC (SEQ ID NO: 209-212) được mô tả trong Fig. 18. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO: 213-215), và trình tự CL1 (SEQ ID NO: 216) được mô tả trong Fig. 18. Theo một phương án, kháng thể theo sáng chế bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ bao gồm trình tự HVR1-LC, HVR2-LC và/hoặc HVR3-LC (SEQ ID NO:

213-215), và trình tự FR1-LC, FR2-LC, FR3-LC và/hoặc FR4-LC (SEQ ID NO: 209-212) trình tự được mô tả trong Fig. 18, và CL1 trình tự được mô tả trong Fig. 18 (SEQ ID NO: 216).

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế bao gồm kháng thể được xử lý bởi xystein trong đó một hoặc nhiều axit amin của kháng thể ban đầu được thay thế với axit amin xystein được bộc lộ trong WO2006/034488; US 2007/0092940. Dạng bất kỳ của kháng thể kháng CD79b cũng có thể được sinh ra, nghĩa là được tạo đột biến. Ví dụ, mảnh kháng thể Fab ban đầu có thể được sinh ra để tạo thành Fab sinh xystein, được đề cập ở đây là "ThioFab." Tương tự, kháng thể đơn dòng ban đầu có thể được sinh ra để tạo thành "ThioMab." Đã lưu ý rằng đột biến vị trí đơn thu được gốc xystein được sinh ra đơn ở ThioFab, trong khi đột biến vị trí đơn thu được hai gốc xystein được sinh ra ở ThioMab, do bản chất dime của kháng thể IgG. Các kháng thể kháng CD79b sinh xystein theo sáng chế bao gồm các kháng thể đơn dòng, kháng thể được làm thích hợp với người hoặc kháng thể đơn dòng khảm và các mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể, các polypeptit dung hợp và các chất tương tự mà tốt hơn là gắn kết tế bào liên quan đến CD79b polypeptit. kháng thể được xử lý bởi xystein có thể tuỳ ý bao gồm kháng thể bao gồm xystein ở vị trí được mô tả ở đây trong kháng thể hoặc Fab, thu được từ mô hình và/hoặc chọn trình tự của kháng thể, mà không cần phải làm thay đổi kháng thể ban đầu, như bằng mô hình và chọn lọc kháng thể thể hiện thể thực khuẩn hoặc thông qua mô hình của các trình tự khung chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng và các vùng cố định. kháng thể được xử lý bởi xystein bao gồm một hoặc nhiều axit amin xystein tự do có giá trị phản ứng thiol nằm trong khoảng từ 0,6 đến 1,0; từ 0,7 đến 1,0 hoặc từ 0,8 đến 1,0. Axit amin tự do là gốc xystein mà đã được sản xuất thành kháng thể ban đầu và không phải là một phần của cầu disulfua. kháng thể được xử lý bởi xystein có thể là hữu ích để gắn các hợp chất độc và/hoặc tạo hình ảnh ở vị trí xystein được sinh ra thông qua, ví dụ, maleimit hoặc haloaxetyl. Hoạt tính phản ứng ưa nhân của nhóm chức thiol của gốc Cys với nhóm maleimit là khoảng 1000 lần lớn hơn so với nhóm chức axit amin khác bất kỳ ở protein, như nhóm amino của gốc lysin hoặc nhóm amino tận cùng N. Nhóm chức đặc hiệu thiol ở các chất phản ứng iodoaxetyl và maleimit có thể phản ứng với các nhóm amin, nhưng độ pH lớn hơn (>9,0) và thời gian phản ứng lâu hơn là cần thiết (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London).

Theo một khía cạnh, kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b theo sáng chế bao gồm xystein được sinh ra ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí sau đây, trong đó các vị trí này được đánh số theo Kabat et al. ở chuỗi nhẹ (xem Kabat et al (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) và theo đánh số EU ở chuỗi nặng (bao gồm vùng Fc) (xem Kabat et al. (1991), nêu trên), trong đó vùng cố định chuỗi nhẹ được mô tả bởi gạch chân trong Fig. 24A, 25A, 26A, 27A, 28, 48A và 49A bắt đầu ở vị trí 109 (đánh số theo Kabat) và vùng cố định chuỗi nặng dược mô tả bởi gạch chân trong các Fig. 24B, 25B, 26B, 27B, 28B, 48B và 49B bắt đầu ở vị trí 118 (đánh số EU). Vị trí này cũng được đề cập bởi vị trí của nó trong đánh số trình tự của axit amin của toàn bộ chiều dài chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng được thể hiện trong các Fig. 24-28, 48 và 49. Theo phương án theo sáng chế, kháng thể kháng CD79b bao gồm xystein được sinh ra ở LC-V205C (số Kabat: Val 205; số trình tự 209 ở Fig. 27A và 49A sinh ra là Cys ở vị trí đó). Xystein được sinh ra trong chuỗi nhẹ được thể hiện nét đậm, được gạch chân kép trong Fig. 27A và 49A. Theo một phương án, kháng thể kháng CD79b bao gồm xystein được sinh ra ở HC-A118C (số EU: Ala 118; số Kabat 114; số trình tự 118 trong Fig. 24B, 25B, 26B, 28B hoặc 48B được sinh ra là Cys ở vị trí đó). Xystein được sinh ra ở chuỗi nặng được thể hiện nét đậm, gạch chân kép trong Fig. 24B, 25B, 26B, 28B hoặc 48B. Theo một phương án, kháng thể kháng CD79b bao gồm xystein được sinh ra ở Fc-S400C (Số EU: Ser 400; Số Kabat 396; số tiếp theo 400 trong Fig. 24B, 25B, 26B, 28B hoặc 48B được sinh ra là Cys ở vị trí đó). Theo phương án khác, xystein được sinh ra của chuỗi nặng (bao gồm vùng Fc) là ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí sau đây (theo Số Kabating với đánh số EU trong dấu ngoặc): 5, 23, 84, 112, 114 (118 Đánh số theo EU), 116 (120 Đánh số theo EU), 278 (282 Đánh số theo EU), 371 (375 Đánh số theo EU) hoặc 396 (400 Đánh số theo EU). Do đó, các thay đổi theo axit amin ở các vị trí này đối với kháng thể kháng CD79b ban đầu được làm thích hợp với người theo sáng chế là: V5C, A23C, A84C, S112C, A114C (A118C Đánh số theo EU), T116C (T120C Đánh số theo EU), V278C (V282C Đánh số theo EU), S371C (S375C Đánh số theo EU) hoặc S396C (S400C Đánh số theo EU). Do đó, các thay đổi theo axit amin ở các vị trí này đối với kháng thể kháng CD79b khảm ban đầu là: Q5C, K23C, S84C, S112C, A114C (A118C Đánh số theo EU), T116C (T120C Đánh số theo EU), V278C (V282C Đánh số theo EU), S371C (S375C Đánh số theo EU) hoặc

S396C (S400C Đánh số theo EU). Do đó, các thay đổi theo axit amin ở các vị trí này đối với kháng thể kháng xynoCD79b ban đầu theo sáng chế là: Q5C, T23C, S84C, S112C, A114C (A118C Đánh số theo EU), T116C (T120C Đánh số theo EU), V278C (V282C Đánh số theo EU), S371C (S375C Đánh số theo EU) hoặc S396C (S400C Đánh số theo EU). Theo phương án khác, xystein được sinh ra của chuỗi nhẹ là ở vị trí bất kỳ trong số các vị trí sau đây (theo đánh số Kabat): 15, 110, 114, 121, 127, 168, 205. Do đó, các thay đổi theo axit amin ở các vị trí này đối với kháng thể kháng CD79b ban đầu được làm thích hợp với người theo sáng chế là: V15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, hoặc V205C. Do đó, các thay đổi theo axit amin ở các vị trí này đối với kháng thể kháng CD79b khảm ban đầu là: L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, hoặc V205C. Do đó, các thay đổi theo axit amin ở các vị trí này đối với kháng thể kháng xynoCD79b ban đầu theo sáng chế là: L15C, V110C, S114C, S121C, S127C, S168C, hoặc V205C.

Theo một khía cạnh, sáng chế bao gồm kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b bao gồm một hoặc nhiều axit amin xystein tự do trong đó kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b gắn kết với CD79b polypeptit và được bào chế bởi quy trình bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin của kháng thể kháng CD79b ban đầu bởi xystein trong đó kháng thể ban đầu bao gồm ít nhất là một trình tự HVR được chọn từ:

(a) HVR-L1 bao gồm trình tự A1-A15, trong đó A1-A15 là KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 131) hoặc KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 137);

(b) HVR-L2 bao gồm trình tự B1-B7, trong đó B1-B7 là AASNLES (SEQ ID NO: 132)

(c) HVR-L3 bao gồm trình tự C1-C9, trong đó C1-C9 là QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 133)

(d) HVR-H1 bao gồm trình tự D1-D10, trong đó D1-D10 là GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 134)

(e) HVR-H2 bao gồm trình tự E1-E18, trong đó E1-E18 là GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 135) và

(f) HVR-H3 bao gồm trình tự F1-F10, trong đó F1-F10 là TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 136) hoặc TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 138).

Theo một số khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b, bao gồm trình tự axit amin có ít nhất là khoảng 80% trình tự axit amin tương đồng, theo cách khác ít nhất là khoảng 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99% hoặc 100% trình tự axit amin tương đồng, với kháng thể được xử lý bởi xystein có toàn bộ trình tự axit amin như được mô tả ở đây, hoặc trình tự axit amin của kháng thể được xử lý bởi xystein thiếu peptit tín hiệu như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh khác nữa, sáng chế đề xuất kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b được phân lập bao gồm trình tự axit amin mà được mã hoá bởi trình tự nucleotit mà lai với phần bổ sung của phân tử ADN mã hoá (a) kháng thể được xử lý bởi xystein có toàn bộ chiều dài trình tự axit amin được mô tả ở đây, (b) trình tự axit amin của kháng thể được xử lý bởi xystein thiếu peptit tín hiệu như được mô tả ở đây, (c) miền ngoại bào của protein kháng thể được xử lý bởi xystein chuyển màng, có hoặc không có peptit tín hiệu, như được mô tả ở đây, (d) trình tự axit amin được mã hoá bởi trình tự axit nucleic bất kỳ được mô tả ở đây hoặc (e) mảnh được xác định đặc hiệu khác của toàn bộ chiều dài trình tự axit amin của kháng thể được xử lý bởi xystein như được mô tả ở đây.

Theo khía cạnh đặc biệt, sáng chế đề xuất kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b được phân lập mà không có trình tự tín hiệu tận cùng N và/hoặc không có methionin khởi đầu và được mã hoá bởi trình tự nucleotit mà mã hoá các trình tự axit amin được mô tả ở đây. Quy trình sản xuất chúng cũng được mô tả ở đây, trong đó quy trình này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ gồm vectơ mà bao gồm phân tử axit nucleic mã hoá thích hợp dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể được xử lý bởi xystein và thu hồi kháng thể được xử lý bởi xystein từ môi trường nuôi cấy tế bào.

Khía cạnh khác theo sáng chế đề xuất kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b được phân lập mà là miền chuyển màng được loại bỏ hoặc miền chuyển màng được làm bất hoạt. Quy trình sản xuất kháng thể này cũng được mô tả ở đây, trong đó các quy trình này bao gồm nuôi cấy tế bào chủ bao gồm vectơ mà bao gồm phân tử axit nucleic mã hoá thích hợp dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể

được xử lý bởi xystein và thu hồi kháng thể được xử lý bởi xystein từ môi trường nuôi cấy tế bào.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được xử lý bởi xystein khảm kháng CD79b được phân lập bao gồm kháng thể được xử lý bởi xystein được mô tả ở đây được dung hợp với (không CD79b) polypeptit được phân lập. Các ví dụ về các phân tử khảm này bao gồm kháng thể được xử lý bởi xystein bất kỳ được mô tả ở đây được dung hợp với polypeptit khác loại như, ví dụ, trình tự epitop tag hoặc vùng Fc của globulin miễn dịch.

Kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b có thể là kháng thể đơn dòng, mảnh kháng thể, kháng thể khảm, kháng thể được làm thích hợp với người, kháng thể chuỗi đơn hoặc kháng thể ức chế cạnh tranh gắn kết kháng thể kháng CD79b polypeptit với epitop kháng nguyên của nó. Các kháng thể theo sáng chế có thể tuỳ ý được liên hợp với chất ức chế phát triển hoặc chất độc tế bào như độc tố bao gồm, ví dụ, auristatin, maytansinoit, dẫn xuất dolostatin hoặc calicheamixin, kháng sinh, chất đồng vị phóng xạ, enzym thuỷ phân nhân hoặc tương tự. Các kháng thể theo sáng chế có thể tuỳ ý được sản xuất ở tế bào CHO hoặc tế bào vi khuẩn và tốt hơn là ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh hoặc gây chết tế bào mà chúng gắn kết. Đối với mục đích chẩn đoán, kháng thể theo sáng chế được đánh dấu có thể phát hiện, được gắn vào chất trợ rắn hoặc tương tự.

Theo khía cạnh khác theo sáng chế, sáng chế đề xuất vectơ bao gồm ADN mã hoá kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD79b được mô tả ở đây và kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b. Các tế bào chủ bao gồm vectơ bất kỳ cũng được đề xuất ở đây. bằng cách ví dụ, các tế bào chủ có thể là các tế bào CHO, tế bào E. coli cells, hoặc tế bào nấm men. Quy trình sản xuất polypeptit bất kỳ được mô tả ở đây cũng được đề xuất và bao gồm nuôi cấy tế bào chủ dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện polypeptit mong muốn và thu hồi polypeptit mong muốn từ môi trường nuôi cấy tế bào.

Các kháng thể được xử lý bởi xystein có thể là hữu ích trong điều trị bệnh ung thư và bao gồm các kháng thể đặc hiệu đối với bề mặt tế bào và các thụ thể chuyển màng và các kháng nguyên liên quan đếnk hối u (TAA). Các kháng thể này có thể được sử dụng làm các kháng thể trần (không được liên hợp với dược chất hoặc phần

chất đánh dấu) hoặc làm các thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC). Các kháng thể được xử lý bởi xystein theo sáng chế có thể được cặp đôi đặc hiệu vị trí và có hiệu quả với chất phản ứng thiol. Chất phản ứng thiol có thể là chất phản ứng cầu liên kết đa chức, chất phản ứng đánh dấu bắt, chất phản ứng flopho hoặc chất trung gian dược chất-cầu liên kết. kháng thể được xử lý bởi xystein có thể được đánh dấu với chất đánh dấu có thể phát hiện, được làm bất động trên chất trợ pha rắn và/hoặc được liên hợp với phần dược chất. Khả năng phản ứng của thiol có thể được khái quát hoá với kháng thể bất kỳ trong đó sự thay thế axit amin với các axit amin xystein phản ứng được tạo ra trong khoảng theo chuỗi nhẹ được chọn tử các khoảng axit amin: L10-L20, L105-L115, L109-L119, L116-L126, L122-L132, L163-L173, L200-L210; và trcng khoảng theo chuỗi nặng được chọn từ các khoảng axit amin: H1-H10, H18-H28, H79-H89, H107-H117, H109-H119, H111-H121, và trong vùng Fc trong các khoảng được chọn từ H270-H280, H366-H376, H391-401, trong đó việc đánh số vị trí axit amin bắt đầu ở vị trí 1 của hệ đánh số Kabat (Kabat et al. (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) và tiếp tục sau đó được mô tả trong WO2006034488; US 2007/0092940. Khả năng phản ứng của thiol cũng có thể được khái quát hoá với một số miền của kháng thể, như miền cố định chuỗi nhẹ (CL) và miền cố định chuỗi nặng, CH1, CH2 và CH3. Các thay thế xystein dẫn đến các giá trị phản ứng thiol là 0,6 và lớn hơn có thể được tạo thành trong các miền cố định chuỗi nặng α, δ, ε, γ, và μ của các kháng thể nguyên vẹn: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, tương ứng, bao gồm các phân lớp IgG: IgG1, IgG2, IgG3, IgG4, IgA, và IgA2. Các kháng thể này và các ứng dụng của chúng được mô tả trong WO2006/034488; US 2007/0092940.

Kháng thể được xử lý bởi xystein theo sáng chế tốt hơn là vẫn có khả năng gắn kết kháng nguyên của kiểu dại của chúng, các bản sao kháng thể ban đầu. Do đó, các kháng thể được xử lý bởi xystein có khả năng gắn kết, tốt hơn là đặc hiệu, với kháng nguyên. Các kháng nguyên này bao gồm, ví dụ, các kháng nguyên kết hợp khối u (TAA), protein thụ thể bề mặt tế bào và các phân tử bề mặt tế bào, các protein chuyển màng, các protein tạo tín hiệu, các yếu tố điều chỉnh hoạt dịch tế bào, các yếu tố điều chỉnh tăng sinh tế bào, các phân tử kết hợp với (ví dụ, đã biết hoặc cho là góp phần vào chức năng) phát triển mô hoặc phân hoá, lymphokin, xytokin, các phân tử liên quan đến điều chỉnh chu trình tế bào, các phân tử liên quan đến tạo mạch và các phân

tử liên quan đến hình thành mạch (ví dụ, đã biết hoặc cho là góp phần vào chức năng). Các kháng nguyên kết hợp khối u có thể là yếu tố phân hoá dạng bó (nghĩa là, CD protein, bao gồm nhưng không chỉ giới hạn đến CD79b). Các kháng thể kháng CD79b sinh xystein theo sáng chế vẫn có khả năng gắn kết kháng nguyên của các sản sao kháng thể kháng CD79b ban đầu của chúng. Do đó, các kháng thể kháng CD79b sinh xystein theo sáng chế có khả năng gắn kết, tốt hơn là đặc hiệu, với các kháng nguyên CD79b bao gồm các dạng phụ kháng CD79b của người beta và/hoặc alpha, bao gồm khi các kháng nguyên này được biểu hiện trên bề mặt của tế bào, bao gồm, mà không giới hạn đến tế bào B.

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với phần đánh dấu bất kỳ mà có thể được gắn vào kháng thể thông qua phần phản ứng, phần được hoạt hoá hoặc nhóm xystein thiol phản ứng (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147-15; Harlow E. and Lane, D. (1999) using Antibodies: A Laboratory Manual, Cold Springs Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, NY; Lundblad R.L. (1991) Chemical Reagents for Protein Modification, 2nd ed. CRC Press, Boca Raton, FL). Chất đánh dấu được gắn có thể có chức năng: (i) tạo tín hiệu có thể phát hiện; (ii) tương tác với chất đánh dấu thứ hai để cải biến tín hiệu có thể phát hiện được tạo ra bởi chất đánh dấu thứ nhất hoặc thứ hai, ví dụ để thu được FRET (chuyển năng lượng từ huỳnh quang); (iii) làm ổn định tương tác hoặc gia tăng ái lực gắn kết, với kháng nguyên hoặc phối tử; (iv) tác động đến tính di động, ví dụ tính di động điện di hoặc tính thấm tế bào, bằng cách mang điện, kỵ nước, tạo hình ảnh hoặc các tham biến vật lý khác, hoặc (v) tạo ra phần bắt, để cải biến ái lực phối tử, gắn kết kháng thể/kháng nguyên hoặc tạo phức hợp ion.

Các kháng thể sinh ra xystein được đánh dấu có thể là hữu ích trong các thử nghiệm chẩn đoán, ví dụ để phát hiện sự biểu hiện của kháng nguyên quan tân ở tế bào, mô hoặc huyết thanh đặc hiệu. Đối với các ứng dụng chẩn đoán, kháng thể sẽ thường được đánh dấu với phần có thể phát hiện. Nhiều chất đánh dấu là hiện có mà thường có thể được phân thành các loại sau đây:

Các chất đồng vị phóng xạ (nuclit phóng xạ), như ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At, hoặc ^{213}Bi. Các kháng thể được đánh dấu đồng vị phóng xạ là hữu ích trong các thử nghiệm tạo hình ảnh đích

thụ thể. kháng thể này có thể được đánh dấu với các chất phản ứng phối tử mà gắn kết, chelat hoặc tạo phức khác kim loại đồng vị phóng xạ trong đó chất phản ứng này là phản ứng với xystein thiol của kháng thể được sinh ra, bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong Current Protocols in Immunology, Volumes 1 and 2, Coligen et al, Ed. Wiley-Interscience, New York, NY, Pubs. (1991). Các phối tử tạo chelat mà có thể tạo phức ion kim loại bao gồm DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA và TETA (Macrocyclics, Dallas, TX). Các nuclit phóng xạ có thể được tạo đích qua việc tạo phức với các thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế (Wu et al (2005) Nature Biotechnology 23(9):1137-1146).

Các chất phản ứng cầu liên kết như DOTA-maleimit (4-maleimidobutyramidobenzyl-DOTA) có thể được bào chế bằng phản ứng của aminobenzyl-DOTA với axit 4-maleimidobutyric (Fluka) được hoạt hoá với isopropylcloformat (Aldrich), theo quy trình của Axworthy et al (2000) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 97(4):1802-1807). Các chất phản ứng DOTA-maleimit phản ứng với ba axit amin xystein của kháng thể được xử lý bởi xystein và tạo ra phối tử tạo phức kim loại trên kháng thể (Lewis et al (1998) Bioconj. Chem. 9:72-86). Các chất phản ứng đánh dấu cầu liên kết chelat như mono (N-hydroxysucxinimit este) của axit DOTA-NHS (1,4,7,10-tetraazaxyclododecan-1,4,7,10-tetraaxetic hiện có bán trên thị trường (Macrocyclics, Dallas, TX). Tạo hình ảnh đích thụ thể với kháng thể được đánh dấu nuclit phóng xạ có thể tạo ra chất đánh dấu của con đường hoạt hoá bằng cách phát hiện và định lượng sự tích tụ trước của kháng thể ở mô khối u (Albert et al (1998) Bioorg. Med. Chem. Lett. 8:1207-1210). Các kim loại phóng xạ được liên hợp có thể vẫn còn trong tế bào sau khi thoái biến lysosom.

Các phức hợp kim loại-chelat thích hợp làm các chất đánh dấu kháng thể đối với các thử nghiệm tạo hình ảnh được mô tả: US 5342606; US 5428155; US 5316757; US 5480990; US 5462725; US 5428139; US 5385893; US 5739294; US 5750660; US 5834456; Hnatowich et al (1983) J. Immunol. Methods 65:147-157; Meares et al (1984) Anal. Biochem. 142:68-78; Mirzadeh et al (1990) Bioconjugate Chem. 1:59-65; Meares et al (1990) J. Cancer1990, Suppl. 10:21-26; Izard et al (1992) Bioconjugate Chem. 3:346-350; Nikula et al (1995) Nucl. Med. Biol. 22:387-90; Camera et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:955-62; Kukis et al (1998) J. Nucl. Med. 39:2105-2110; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Camera et al (1994) J.

Nucl. Med. 21:640-646; Ruegg et al (1990) Cancer Res. 50:4221-4226; Verel et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1663-1670; Lee et al (2001) Cancer Res. 61:4474-4482; Mitchell, et al (2003) J. Nucl. Med. 44:1105-1112; Kobayashi et al (1999) Bioconjugate Chem. 10:103-111; Miederer et al (2004) J. Nucl. Med. 45:129-137; DeNardo et al (1998) Clinical Cancer Research 4:2483-90; Blend et al (2003) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals 18:355-363; Nikula et al (1999) J. Nucl. Med. 40:166-76; Kobayashi et al (1998) J. Nucl. Med. 39:829-36; Mardirossian et al (1993) Nucl. Med. Biol. 20:65-74; Roselli et al (1999) Cancer Biotherapy & Radiopharmaceuticals, 14:209-20.

Các chất đánh dấu huỳnh quang như các chất chelat đất hiếm (các chất chelat europi), các loại fluorescein bao gồm FITC, 5-carboxyfluorescein, 6-carboxy fluorescein; các loại rhodamin bao gồm TAMRA; dansyl; Lissamin; xyanin; phycoerythrin; Texas Red; và các chất tương tự của chúng. Các chất đánh dấu huỳnh quang có thể được liên hợp với các kháng thể bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong Current Protocols in Immunology, nêu trên, chẳng hạn. Các thuốc nhuộm huỳnh quang và các chất phản ứng đánh dấu huỳnh quang bao gồm các chất mà hiện có bán trên thị trường của Invitrogen/Molecular Probes (Eugene, OR) và Pierce Biotechnology, Inc. (Rockford, IL).

Các chất đánh dấu enzym-chất nền khác nhau là hiện có hoặc được mô tả (US 4275149). Enzym thường xúc tác thay đổi hoá học chất nền sinh màu mà có thể được xác định bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau. Ví dụ, enzym có thể xúc tác thay đổi màu ở chất nền, mà có thể được xác định về mặt quang phổ. Theo cách khác, enzym có thể làm thay đổi huỳnh quang hoặc hoá huỳnh quang chất nền. Các kỹ thuật để định lượng thay đổi huỳnh qung như được mô tả trên đây. Chất nền hoá huỳnh quang trở nên được kích thích điện tích bởi phản ứng hoá học và sau đó có thể phát ra ánh sáng mà có thể được xac định (bằng cách sử dụng thiết bị đo phát quang hoá học, ví dụ) hoặc cho năng lượng thụ thể huỳnh quang. Các ví dụ về các chất đánh dấu enzym bao gồm luxiferaza (ví dụ, luxiferaza đom đóm và luxiferaza vi khuẩn; US 4737456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazinedion, malat dehydrogenaza, ureaza, peroxidaza như horseradish peroxidaza (HRP), phosphataza kiềm (AP), β-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza (ví dụ, glucoza oxidaza,

galactoza oxidaza và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza), oxidaza dị vòng (như uricaza và xanthin oxidaza), lactoperoxidaza, microperoxidaza và tương tự. Các kỹ thuật liên hợp enzym với kháng thể được mô tả trong O'Sullivan et al (1981) "Methods for the Preparation of Enzyme-Antibody Conjugates for use in Enzyme Immunoassay", in Methods in Enzym. (ed J. Langone & H. Van Vunakis), Academic Press, New York, 73:147-166.

Các ví dụ về các kết hợp enzym-chất nền bao gồm, ví dụ:

(i) Horseradish peroxidaza (HRP) với hydro peroxidaza làm chất nền, trong đó hydro peroxidaza oxy hoá tiền chất nhuộm (ví dụ, orthophenylen diamin (OPD) hoặc 3,3',5,5'-tetrametylbenzidin hydroclorua (TMB));

(ii) phosphataza kiềm (AP) với para-nitrophenyl phosphat làm chất sinh màu; và

(iii) β-D-galactosidaza (β-D-Gal) với chất nền sinh màu (ví dụ, p-nitrophenyl-β-D-galactosidaza) hoặc chất nền flogen 4-metylumbelliferyl-β-D-galactosidaza.

Nhiều kết hợp enzym-chất nền khác là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Để xem xét chung hơn, xem US 4275149 và US 4318980.

Chất đánh dấu có thể được liên hợp gián tiếp với chuỗi phụ axit amin, chuỗi phụ axit amin được hoạt hoá, kháng thể được xử lý bởi xystein và tương tự. Ví dụ, kháng thể có thể được liên hợp với biotin và chất bất kỳ trong số ba loại chất đánh dấu chính được xác định trên đây có thể được liên hợp với avidin hoặc streptavidin, hoặc ngược lại. Biotin gắn kết chọn lọc với streptavidin và do đó, chất đánh dấu có thể được liên hợp với kháng thể theo cách gián tiếp này. Theo cách khác, để đạt được liên hợp gián tiếp của chất đánh dấu với biến thể polypeptit, biến thể polypeptit được liên hợp với hapten nhỏ (ví dụ, digoxin) và chất thuộc loại chất đánh dấu khác nhau được nêu trên đây được liên hợp với biến thể polypeptit kháng hapten (ví dụ, kháng thể kháng digoxin). Do đó, liên hợp gián tiếp của chất đánh dấu với biến thể polypeptit có thể đạt được (Hermanson, G. (1996) in Bioconjugate Techniques Academic Press, San Diego).

Kháng thể theo sáng chế có thể được dùng theo phương pháp thử nghiệm đã biết bất kỳ, như ELISA, thử nghiệm gắn kết cạnh tranh, thử nghiệm sandwich trực tiếp

và gian tiếp và các thử nghiệm kết tủa miễn dịch (Zola, (1987) Monoclonal Antibodies: A Manual of Techniques, pp.147-158, CRC Press, Inc.).

Chất đánh dấu phát hiện có thể là hữu ích để định vị, khu trú, quan sát và định lượng sự kiện gắn kết hoặc nhận biết. Các kháng thể được đánh dấu theo sáng chế có thể phát hiện các thụ thể bề mặt tế bào. Sử dụng khác đối với các kháng thể được đánh dấu phát hiện là phương pháp bắt miễn dịch dựa trên hạt bao gồm liên hợp hạt với kháng thể được đánh dấu huỳnh quang và phát hiện tín hiệu huỳnh quang ngay khi gắn kết phối tử. Các phương pháp phát hiện tương tự sử dụng tác động cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) để xác định và phát hiện các tương tác kháng thể-kháng nguyên.

Các chất đánh dấu phát hiện như thuốc nhuộm huỳnh quang và thuốc nhuộm hoá phát quang (Briggs et al (1997) "Synthesis of Functionalised Fluorescent Dyes and Their Coupling to Amins and Amino Acids," J. Chem. Soc., Perkin-Trans. 1:1051-1058) tạo ra tín hiệu có thể phát hiện và thường có thể áp dụng đối với các kháng thể đánh dấu, tốt hơn là với các đặc tính sau đây: (i) các kháng thể được đánh dấu sẽ tạo ra tín hiệu rất cao với khung thấp sao cho lượng nhỏ kháng thể có thể được phát hiện nhạy ở các thử nghiệm không tế bào và dựa trên tế bào; và (ii) kháng thể được đánh dấu sẽ có thể là ổn định ánh sáng sao cho tín hiệu huỳnh quang có thể được quan sát, được kiểm sáot và ghi lại mà không có chất khử màu sáng đáng kể. Đối với các áp dụng bao gồm gắn kết bề mặt tế bào của kháng thể được đánh dấu với màng hoặc bề mặt tế bào, đặc biệt là tế bào sống, các chất đánh dấu tốt hơn là (iii) có tính hoà tan tốt trong nước để đạt được nồng độ liên hợp hiệu quả và dễ phát hiện và (iv) không độc tố với tế bào sống do không phá vỡ quy trình trao đổổ chất thông thường của tế bào hoặc gây chết tế bào sớm.

Định lượng trực tiếp cường độ huỳnh quang tế bào và liệt kê các sự kiện được đánh dấu huỳnh quang, ví dụ gắn kết bề mặt tế bào của các thể liên hợp peptit-thuốc nhuộm có thể được thực hiện trên hệ (FMAT® 8100 HTS System, Applied Biosystems, Foster City, Calif.) mà từ tự động hoá các thử nghiệm hỗn hợp và đọc, không phóng xạ với các tế bào sống hoặc hạt (Miraglia, "Homogeneous cell-and bead-based assays for high throughput screening using flometric microvolume assay technology", (1999) J. of Biomolecular Screening 4:193-204). Sử dụng các kháng thể được đánh dấu cũng bao gồm các thử nghiệm nghiệm gắn kết thụ thể bề mặt tế bào,

thử nghiệm bắt miễn dịch, thử nghiệm bám dính miễn dịch liên kết huỳnh quang (FLISA), phân tách caspaza (Zheng, "Caspase-3 controls both cytoplasmic and nuclear events associated with Fas-mediated apoptosis in vivo", (1998) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95:618-23; US 6372907), giết chết tế bào (Vermes, "A novel assay for apoptosis. Flow cytometric detection of phosphatidylserine expression on early apoptotic cells using fluorescein labelled Annexin V" (1995) J. Immunol. Methods 184:39-51) và các thử nghiệm độc tố tế bào. Kỹ thuật thử nghiệm vi thể tích flo có thể được sử dụng để nhận biết điều chỉnh tăng hoặc giảm bởi phân tử mà được tạo đích với bề mặt tế bào (Swartzman, "A homogeneous and multiplexed immunoassay for high-throughput screening using flometric microvolume assay technology", (1999) Anal. Biochem. 271:143-51).

Các kháng thể được đánh dấu theo sáng chế là hữu ích làm các chất đánh dấu sinh học hoặc các đầu dò tạo hình ảnh bởi các phương pháp khác nhau và các kỹ thuật tạo hình ảnh y sinh và phân tử như: (i) MRI (tạo hình ảnh cộng hưởng từ); (ii) MicroCT (chụp cắt lớp vi tính); (iii) SPECT (chụp cắt lớp vi tính phát ra photon đơn); (iv) PET (chụp cắt lớp phát ra positron) Chen et al (2004) Bioconjugate Chem. 15:41-49; (v) sinh phát quang; (vi) huỳnh quang; và (vii) siêu âm. Tạo hình ảnh nhấp nháy miễn dịch là quy trình tạ hình ảnh trong đó kháng thể được đánh dấu với chất phóng xạ được xác định đối với động vật hoặc người bệnh và hình ảnh được lấy ở các vị trí trong cơ thể trong đó kháng thể định vị (US 6528624). Các chất đánh dấu sinh học tạo hình ảnh có thể được xác định khách quan và đánh giá như chất chỉ thị của quy trình sinh học thông thường, quy trình bệnh lý hoặc đáp ứng dược lý với can thiệp điều trị. Các chất dánh dấu sinh học có thể là một vài kiểu: Kiểu 0 là chất đánh dấu lịch tử tự nhiên của bệnh và liên quan theo chiều dọc với các chỉ số lâm sàng đã biết, ví dụ thử nghiệm MRI của bệnh viêm hoạt dịch trong bệnh viêm khớp dạng thấp; chất đánh dấu Kiểu I bắt hiệu quả sự can thiệp theo cơ chế tác dụng, thậm chí thông qua cơ chế này không thể kết hợp với kết quả lâm sàng; chất đánh dấu Kiểu II có chức năng thay thế các điểm cuối trong đó thay đổi trong hoặc tín hiệu từ, chất đánh dấu sinh học dự báo lợi ích lâm sàng để "phê chuẩn" đáp ứng được tạo đích, như sự ăn mòn xương được xác định ở bệnh viên khớp dạng thấp bởi CT. Các chất đánh dấu sinh học tạo hình ảnh do đó có thể tạo ra thông tin điều trị dược động học (PD) khoảng: (i) biểu hiện protein đích, (ii) gắn kết của điều trị với protein đích, nghĩa là tính chọn lọc và (iii) tính rõ

ràng và các dữ liệu dược động học nửa chu kỳ phân rã. Các thuận lợi của các chất đánh dấu sinh học tạo hình ảnh in vivo liên quan đến các chất đánh dấu sinh học dựa trên phòng thí nghiệm bao gồm: điều trị không xâm lấn, khả năng định lượng, thử nghiệm toàn bộ cơ thể, liều lặp lại và đánh giá, nghĩa là nhiều điểm thời gian và hiệu quả có thể di chuyển hiệu lực từ các kết quả cận lâm sàng (động vật nhỏ) đến lâm sàng (con người). Đối với một số ứng dụng, các chất thay thế tạo hình ảnh sinh học hoặc giảm thiểu số lượng thử nghiệm động vật trong nghiên cứu cận lâm sàng.

Các phương pháp đánh dấu peptit là đã biết. Xem Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, (1997) Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1:2; Glazer et al (1975) Chemical Modification of Proteins. Laboratory Techniques in Biochemistry and Molecular Biology (T. S. Work and E. Work, Eds.) American Nếu khôngvier Publishing Co., New York; Lundblad, R. L. and Noyes, C. M. (1984) Chemical Reagents for Protein Modification, Vols. I and II, CRC Press, New York; Pfleiderer, G. (1985) "Chemical Modification of Proteins", Modern Methods in Protein Chemistry, H. Tschesche, Ed., Walter DeGryter, Berlin and New York; và Wong (1991) Chemistry of Protein Conjugation and Cross-linking, CRC Press, Boca Raton, Fla.); De Leon-Rodriguez et al (2004) Chem.Eur. J. 10:1149-1155; Lewis et al (2001) Bioconjugate Chem. 12:320-324; Li et al (2002) Bioconjugate Chem. 13:110-115; Mier et al (2005) Bioconjugate Chem. 16:240-237.

Các peptit và protein được đánh dấu với hai phần, thông báo và làm ngừng huỳnh quang ở trạng thái gần kề đủ để trải qua truyền năng lượng từ huỳnh quang (FRET). Các nhóm thông báo thường là các chất nhuộm mà bị kích thích bởi ánh sáng ở một số bước sóng và chuyển năng lượng đến thụ thể hoặc chất làm ngừng, nhóm, với sự dịch chuyển Stokes thích hợp để phát ra độ sáng tối đa. Các thuốc nhuộm huỳnh quang bao gồm các phân tử với tính thơm kéo dài như floresxein và rhodamin và các dẫn xuất của chúng. Các chất thông báo huỳnh quang có thể được làm ngừng một phần hoặc đáng kể bởi phần làm ngừng trong peptit nguyên vẹn. Ngay khi phân tách peptit bởi peptidaza hoặc proteaza, có thể phát hiện gia tăng trong huỳnh quang có thể được xác định (Knight, C. (1995) "Fluorimetric Assays of Proteolytic Enzymes", Methods in Enzymology, Academic Press, 248:18-34).

Các kháng thể được đánh dấu theo sáng chế cũng có thể được sử dụng làm chất tinh chế ái lực. Trong quy trình này, kháng thể được đánh dấu được làm bất động trên pha rắn như nhựa Sephadex hoặc giấy lọc, bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. kháng thể được làm bất động được cho tiếp xúc với mẫu chứa kháng nguyên sẽ được tinh chế và sau đó rửa chất trợ với dung môi thích hợp mà sẽ loại bỏ về căn bản là tất cả nguyên liệu trong mẫu ngoại trừ kháng nguyên sẽ được tinh chế, mà được gắn kết với biến thể polypeptit được làm bất động. Cuối cùng, rửa chất đỡ với dung môi thích hợp khác như chất đệm glyxin, độ pH = 5,0, mà sẽ giải phóng kháng nguyên khỏi biến thể polypeptit.

Các chất phản ứng đánh dấu thường mang chức năng phản ứng mà có thể phản ứng (i) trực tiếp với xystein thiol của kháng thể được xử lý bởi xystein để tạo thành kháng thể được đánh dấu, (ii) với chất phản ứng cầu liên kết để tạo thành chất trung gian đánh dấu cầu liên kết, hoặc (iii) với kháng thể cầu liên kết để tạo thành kháng thể được đánh dấu. Chức năng phản ứng của các chất phản ứng đánh dấu bao gồm: maleimit, haloaxetyl, iodoaxetamit sucxinimidyl este (ví dụ NHS, N-hydroxysucxinimit), isothioxyanat, sulfonyl clorua, 2,6-dichlorotriazinyl, pentaflophenyl este và phosphoramidit, thông qua các nhóm chức khác có cũng có thể được sử dụng.

Nhóm chức phản ứng ví dụ là N-hydroxysucxinimidyl este (NHS) của phần tử thế nhóm carboxyl của chất đánh dấu có thể phát hiện, ví dụ thuốc nhuộm biotin hoặc huỳnh quang. NHS este của chất đánh dấu này có thể được bào chế trước, phân lập, tinh chế và/hoặc tạo đặc trưng hoặc có thể được tạo thành in situ và được phản ứng với nhóm ưa nhân của kháng thể. Thông thường, dạng carboxyl của chất đánh dấu được hoạt hoá bằng cách phản ứng với kết hợp giống nhau của chất phản ứng carbodiimit, ví dụ dixyclohexylcarbodiimit, diisopropylcarbodiimit hoặc chất phản ứng uroni, ví dụ TSTU (O-(N-Sucxinimidyl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni tetrafloborat, HBTU (O-benzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat) hoặc HATU (O-(7-azabenzotriazol-1-yl)-N,N,N',N'-tetrametyluroni hexaflophosphat), chất hoạt hoá, như 1-hydroxybenzotriazol (HOBt), và N-hydroxysucxinimit để thu được NHS este của chất đánh dấu. Trong một số trường hợp, chất đánh dấu và kháng thể có thể được cặp đôi bằng cách hoạt hoá in situ chất đánh dấu và phản ứng với kháng thể để tạo thành liên hợp chất đánh dấu-kháng thể trong một bước. Chất phản ứng hoạt hoá và cặp đôi

khác bao gồm TBTU (2-(1H-benzotriazo-1-yl)-1-1,3,3-tetrametyluroni hexaflophosphat), TFFH (N,N',N",N'"-tetrametyluroni 2-flo-hexaflophosphat), PyBOP (benzotriazol-1-yl-oxy-tris-pyrrolidino-phosphoni hexaflophosphat, EEDQ (2-etoxy-1-etoxycarbonyl-1,2-dihydro-quinolin), DCC (dixyclohexylcarbodiimi); DIPCDI (diisopropylcarbodiimit), MSNT (1-(mesitylen-2-sulfonyl)-3-nitro-1H-1,2,4-triazol và aryl sulfonyl halogenua, ví dụ triisopropylbenzensulfonyl clorua.

Peptit gắn kết albumin-hợp chất Fab theo sáng chế:

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế được dung hợp với protein gắn kết albumin. Gắn kết protein huyết tương có thể là phương pháp hiệu quả cải thiện các đặc tính dược lực của các phân tử hoạt động ngắn. Albumin là protein dư thừa trong huyết tương. Các peptit gắn kết albumin huyết thanh (ABP) có thể làm thay đổi dược động học của các protein miền hoạt tính được dung hợp, bao gồm thay đổi hấp thu mô, tính thấm và khuếch tán. Các tham biến dược động học này có thể được điều biến bằng cách chọn lọc đặc hiệu trình tự peptit gắn kết albumin huyết thanh thích hợp (US 20040001827). Loạt peptit gắn kết albumin huyết thanh được nhận biết bằng cách sàng lọc thể hiện thể thực khuẩn (Dennis et al. (2002) "Albumin Binding As A General Strategy For Improving The Pharmacokinetics Of Proteins" J Biol Chem. 277:35035-35043; WO 01/45746). Các hợp chất theo sáng chế bao gồm các trình tự ABP được mô tả bởi: (i) Dennis et al (2002) J Biol Chem. 277:35035-35043 ở các Bảng III và IV, trang 35038; (ii) US 20040001827 ở [0076] SEQ ID NOS: 9-22; và (iii) WO 01/45746 ở các trang 12-13. (ABP)-Fabs gắn kết albumin được tạo ra bằng cách dung hợp peptit gắn kết albumin với tận cùng C của chuỗi nặng Fab theo hệ số tỷ lệ 1:1 (1 ABP / 1 Fab). Đã thể hiện rằng việc kết hợp của các ABP-Fabs với albumin làm gia tăng chu kỳ nửa phân rã của kháng thể nhiều hơn 25 lần ở thỏ và chuột. Các gốc Cys phản ứng được mô tả trên đây do đó có thể được đưa vào ABP-Fabs và được sử dụng cho liên hợp đặc hiệu vị trí với các dược chất độc tiếp theo bởi các nghiên cứu động vật in vivo.

Trình tự peptit gắn kết albumin ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến trình tự axit amin được liệt kê trong SEQ ID NOS: 246-250:

CDKTHTGGGSQRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 246

QRLMEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 247

QRLIEDICLPRWGCLWEDDF SEQ ID NO: 248

RLIEDICLPRWGCLWEDD SEQ ID NO: 249

DICLPRWGCLW SEQ ID NO: 250

Thể liên hợp kháng thể-dược chất

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất các thể liên hợp miễn dịch hoặc thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC), bao gồm kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào như chất hoá trị liệu, dược chất, chất ức chế phát triển, độc tố (ví dụ, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật hoặc các mảnh của chúng), hoặc chất đồng vị phóng xạ (nghĩa là, liên hợp phóng xạ). Theo khía cạnh khác, sáng chế còn đề xuất phương pháp sử dụng các thể liên hợp miễn dịch. Theo một khía cạnh, liên hợp miễn dịch bao gồm các kháng thể kháng CD79b trên đây được gắn kết cộng hoá trị với chất độc tế bào hoặc chất có thể phát hiện khác.

Theo một khía cạnh, kháng thể CD79b theo sáng chế gắn kết với epitop giống nhau trên CD79b được gắn kết bởi kháng thể CD79b khác. Theo phương án khác, kháng thể CD79b theo sáng chế gắn kết với epitop giống nhau trên CD79b được gắn kết bởi mảnh Fab của kháng thể đơn dòng được sinh ra từ thể lai được lưu giữ với ATCC như HB11413 ngày 20/7/1993, kháng thể đơn dòng bao gồm các miền biến đổi của SEQ ID NO: 10 (Các Fig. 7A-B) và SEQ ID NO: 14 (Các Fig. 8A-B) hoặc kháng thể khảm bao gồm miền biến đổi của kháng thể được sinh ra từ các thể lai HB11413 được lưu giữ với ATCC ngày 20/7/1993 và các miền cố định từ IgG1, hoặc các miền biến đổi của kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự của SEQ ID NO: 10 (Các Fig. 7A-B) và SEQ ID NO: 14 (Các Fig. 8A-B). Theo phương án khác, kháng thể CD79b theo sáng chế gắn kết với epitop giống nhau trên CD79b được gắn kết bởi kháng thể CD79b khác (nghĩa là, CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), kháng kháng CD79b của người (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

Theo khía cạnh khác, kháng thể CD79b theo sáng chế gắn kết với epitop trên CD79b khác biệt với epitop được gắn kết bởi kháng thể CD79b khác. Theo phương án khác, kháng thể CD79b theo sáng chế gắn kết với epitop trên CD79b khác biệt với

epitop được gắn kết bởi mảnh Fab, kháng thể đơn dòng được sinh ra từ các thể lai HB11413 được lưu giữ với ATCC ngày 20/7/1993, kháng thể đơn dòng bao gồm các miền biến đổi của SEQ ID NO: 10 (Các Fig. 7A-B) và SEQ ID NO: 14 (Các Fig. 8A-B), hoặc kháng thể khảm bao gồm miền biến đổi của kháng thể được sinh ra từ các thể lai HB11413 được lưu giữ với ATCC ngày 20/7/1993 và các miền cố định từ IgG1, hoặc các miền biến đổi của kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự của SEQ ID NO: 10 (Các Fig. 7A-B) và SEQ ID NO: 14 (Các Fig. 8A-B). Theo phương án khác, kháng thể CD79b theo sáng chế gắn kết với epitop trên CD79b khác biệt với epitop trên CD79b được gắn kết bởi kháng thể CD79b khác (nghĩa là, CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), kháng thể kháng CD79b của người (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

Theo khía cạnh khác, kháng thể CD79b theo sáng chế là khác biệt với (nghĩa là, không phải là) mảnh Fab, kháng thể đơn dòng được sinh ra từ các thể lai được lưu giữ với ATCC như HB11413 ngày 20/7/1993, kháng thể đơn dòng bao gồm các miền biến đổi của SEQ ID NO: 10 (Các Fig. 7A-B) và SEQ ID NO: 14 (Các Fig. 8A-B), hoặc kháng thể khảm bao gồm miền biến đổi của kháng thể được sinh ra từ các thể lai được lưu giữ với ATCC như HB11413 ngày 20/7/1993 và các miền cố định của IgG1, hoặc các miền biến đổi của kháng thể đơn dòng bao gồm các trình tự của SEQ ID NO: 10 (Các Fig. 7A-B) và SEQ ID NO: 14 (Các Fig. 8A-B). Theo phương án khác, kháng thể CD79b theo sáng chế khác biệt với (nghĩa là, không phải là) mảnh Fab của kháng thể CD79b khác ((nghĩa là, CB3.1 (BD Biosciences Catalog #555678; San Jose, CA), AT105-1 (AbD Serotec Catalog #MCA2208; Raleigh, NC), AT107-2 (AbD Serotec Catalog #MCA2209), kháng thể kháng CD79b của người (BD Biosciences Catalog #557592; San Jose, CA)).

Theo một khía cạnh, kháng thể theo sáng chế gắn kết đặc hiệu với CD79b của các loài động vật thứ nhất, và và không gắn kết đặc hiệu với CD79b của các loài động vật thứ hai. Theo một phương án, các loài động vật thứ nhất là con người và/hoặc động vật linh trưởng (ví dụ, khỉ xynomolgus), và các loài động vật thứ hai là loài gặm nhấm (ví dụ, chuột) và/hoặc họ răng nanh. Theo một phương án, các loài động vật thứ nhất là con người. Theo một phương án, các loài động vật thứ nhất là động vật linh trưởng,

ví dụ khỉ xynomolgus. Theo một phương án, các loài động vật thứ hai là động vật gặm nhấm, ví dụ chuột. Theo một phương án, các loài động vật thứ hai là loài có răng nanh.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể theo sáng chế và chất mang. Theo một phương án, chất mang là dược dụng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất axit nucleic mã hoá kháng thể CD79b theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vectơ bao gồm axit nucleic theo sáng chế.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm axit nucleic hoặc vectơ theo sáng chế. Vectơ có thể thuốc kiểu bất kỳ, ví dụ vectơ tái tổ hợp như vectơ biểu hiện. Nhiều tế bào chủ có thể được sử dụng. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình, ví dụ, *E. coli*. Theo một phương án, tế bào chủ là sinh vật nhân điển hình, ví dụ tế bào động vật có vú như tế bào buồng trứng của chuột đồng trung Quốc (CHO).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể theo sáng chế. Ví dụ, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể CD79b (mà như được xác định ở đây bao gồm toàn bộ chiều dài và mảnh của nó), phương pháp này bao gồm biểu hiện trong tế bào chủ thích hợp vectơ tái tổ hợp theo sáng chế mã hoá kháng thể (hoặc mảnh của nó) và thu hồi kháng thể này.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất vật phẩm sản xuất bao gồm vật chứa; và chế phẩm được chứa trong vật phẩm, trong đó chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể CD79b theo sáng chế. Theo một phương án, chế phẩm bao gồm axit nucleic theo sáng chế. Theo một phương án, chế phẩm bao gồm kháng thể còn bao gồm chất mang, mà theo một số phương án là dược dụng. Theo một phương án, vật phẩm sản xuất theo sáng chế còn bao gồm hướng dẫn sử dụng chế phẩm (ví dụ, kháng thể) cho đối tượng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuấtkit bao gồm vật chứa thứ nhất bao gồm chế phẩm bao gồm một hoặc nhiều kháng thể CD79b theo sáng chế; và vật chứa thứ hai bao gồm chất đệm. Theo một phương án, chất đệm là dược dụng. Theo một phương án, chế phẩm bao gồm kháng thể chất đối kháng còn bao gồm chất mang, mà theo một số phương án là dược dụng. Theo một phương án, kit còn bao gồm hướng dẫn để sử dụng chế phẩm (ví dụ, kháng thể) cho đối tượng.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc xử dụg kháng thể CD79b theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Theo một phương án, bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và u bạch huyết tế bào vỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc xử dụg axit nucleic theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Theo một phương án, bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và u bạch huyết tế bào vỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc xử dụng vectơ biểu hiện theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Theo một phương án, bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và u bạch huyết tế bào vỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc xử dụng tế bào chủ theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Theo một phương án, bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và u bạch huyết tế bào vỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc xử dụng vật phẩm sản xuất theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Theo một phương án, bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và u bạch huyết tế bào vỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất việc xử dụng kit theo sáng chế để bào chế thuốc để chữa bệnh và/hoặc điều trị ngăn ngừa bệnh, như bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào. Theo một phương án, bệnh ung thư, khối u và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và u bạch huyết tế bào vỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển của tế bào biểu hiện CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế nhờ đó gây ức chế sự phát triển của tế bào này. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị động vật có vú mắc khối u gây bệnh ung thư bao gồm tế bào biểu hiện CD79b, phương pháp này bao gồm cho động vật có vú dùng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó điều trị hiệu quả động vật có vú này. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn tăng sinh tế bào liên quan đến sự biểu hiện gia tăng của CD79b, phương pháp này bao gồm cho đối tượng cần điều trị này dùng lượng có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó điều trị hoặc ngăn ngừa hiệu quả rối loạn tăng sinh tế bào này. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào là bệnh ung thư. Theo một phương án, kháng

thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển của tế bào, trong đó sự phát triển của tế bào này ít nhất là một phần phụ thuộc vào hiệu quả hiệu lực phát triển của CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với lượng có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó ức chế sự phát triển của tế bào này. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị khối u ở động vật có vú, trong đó sự phát triển của khối u ít nhất là một phần phụ thuộc vào tác động tiềm năng sự phát triển của CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với lượng có hiệu quả của kháng thể theo sáng chế, nhờ đó điều trị hiệu quả khối u này. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế sự phát triển.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm cho người bệnh dùng dược phẩm chứa thể liên hợp miễn dịch được mô tả ở đây, chất pha loãng, chất mang dược dụng hoặc tá dược. Theo một phương án, bệnh ung thư được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL) và u bạch huyết tế bào vỏ. Theo một phương án, người bệnh được dùng chất độc tế bào kết hợp với thể liên hợp kháng thể-dược chất.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế tăng sinh tế bào B bao gồm cho tế bào tiếp xúc với thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể theo sáng chế dưới các điều kiện cho phép gắn kết của liên hợp miễn dịch với CD79b. Theo một phương án, tăng sinh tế bào B được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkins (NHL), NHL xâm lấn, NHL tái xâm lấn, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL) và u bạch huyết tế bào vỏ. Theo một phương án, tế bào

B là mảnh ghép khác loại. Theo một phương án, việc tiếp xúc được thực hiện in vitro. Theo một phương án, việc tiếp xúc được thực hiện in vivo.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp xác định sự có mặt của CD79b trong mẫu bị cho là chứa CD79b, phương pháp này bao gồm cho mẫu này tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế và xác định sự gắn kết của kháng thể này với CD79b ở mẫu này trong đó gắn kết của kháng thể với CD79b trong mẫu là cho biết sự có mặt của protein trong mẫu. Theo một phương án, mẫu là mẫu sinh học. Theo phương án khác, mẫu sinh học bao gồm tế bào B. Theo một phương án, mẫu sinh học là từ động vật có vú trải qua hoặc được cho là trải qua rối loạn tế bào B và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào B bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, tế bào bạch cầu, bạch huyết không Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, xâm chiếm lại NHL, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch huyết, bệnh bạch huyết tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL) và bệnh bạch cầu tế bào vỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán rối loạn tăng sinh tế bào liên quan đến gia tăng ở tế bào, như tế bào B, biểu hiện CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào thử nghiệm trong mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể bất kỳ trên đây; xác định mức kháng thể được gắn kết với tế bào thử nghiệm trong mẫu này bằng cách phát hiện gắn kết của kháng thể với CD79b; và so sánh mức kháng thể được gắn kết với tế bào ở mẫu đối chứng, trong đó mức kháng thể được gắn kết là được làm bình thường hoá với số lượng tế bào biểu hiện CD79b ở các mẫu thử nghiệm và đối chứng và trong đó mức kháng thể cao được gắn kết ở mẫu thử nghiệm như được so với mẫu đối chứng cho biết sự có mặt của rối loạn tăng sinh tế bào liên quan đến tế bào biểu hiện CD79b.

Theo một khía cạnh, phương pháp phát hiện CD79b có thể hoà tan trong máu hoặc huyết thanh, phương pháp này bao gồm cho mẫu thử nghiệm tiếp xúc với máu hoặc huyết thanh từ động vật có vú dễ trải qua rối loạn tăng sinh tế bào B với kháng thể kháng CD79b theo sáng chế và phát hiện sự gia tăng CD79b có thể hoà tan trong mẫu thử nghiệm liên quan đến mẫu đối chứng của máu hoặc huyết thanh từ động vật có vú thông thường. Theo một phương án, phương pháp phát hiện là hữu ích làm phương pháp chẩn đoán rối loạn tăng sinh tế bào B với việc gia tăng CD79b có thể hoà tan trong máu hoặc huyết thanh của động vật có vú.

Theo một khía cạnh, phương pháp gắn kết kháng thể theo sáng chế với tế bào biểu hiện CD79b, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với kháng thể theo sáng chế. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào. Theo một phương án, kháng thể được liên hợp với chất ức chế phát triển.

Phương pháp theo sáng chế có thể được sử dụng để tác động đến tình trạng bệnh lý thích hợp bất kỳ, ví dụ, tế bào và/hoặc mô liên quan đến sự biểu hiện của CD79b. Theo một phương án, tế bào được tạo đích trong phương pháp theo sáng chế là tế bào tạo huyết. Ví dụ, tế bào tạo huyết có thể là tế bào được chọn từ nhóm bao gồm tế bào bạch cầu, bạch huyết, tuyếu huyết cầu, hồng cầu và tế bào giết chết tụ nhiên. Theo một phương án, tế bào được tạo đích theo phương pháp theo sáng chế là tế bào B hoặc tế bào T. Theo một phương án, tế bào được tạo đích theo phương pháp theo sáng chế là tế bào ung thư. Ví dụ, tế bào ung thư có thể là tế bào được chọn từ nhóm bao gồm tế bào bạch cầu, tế bào bạch huyết hoặc tế bào u tuỷ.

Phương pháp theo sáng chế có thể bao gồm các bước điều trị bổ sung. Ví dụ, theo một phương án, phương pháp còn bao gồm bước trong đó tế bào được tạo đích và/hoặc mô (ví dụ, tế bào ung thư) được cho tiếp xúc với điều trị phóng xạ hoặc chất hoá trị liệu.

Như được mô tả ở đây, CD79b là hợp phần tạo tín hiệu của thụ thể tế bào B. Do đó, theo một phương án của phương pháp theo sáng chế, tế bào được tạo đích (ví dụ, tế bào ung thư) là tế bào trong đó CD79b được biểu hiện như được so với tế bào mà không biểu hiện CD79b. Theo phương án khác, tế bào được tạo đích là tế bào ung thư trong đó sự biểu hiện CD79b được tăng cường như được so với tế bào không ung thư thông thường thuộc loại mô giống nhau. Theo một phương án, phương pháp theo sáng chế gây chết tế bào đích.

Theo khía cạnh khác theo sáng chế, sáng chế đề xuất các vectơ bao gồm ADN mã hoá kháng thể bất kỳ được mô ở đây. Tế bào chủ bao gồm vectơ cũng được đề xuất. Theo cách ví dụ, các tế bào chủ có thể là tế bào CHO, tế bào E. coli hoặc tế bào nấm men. Quy trình sản xuất kháng thể bất kỳ đợc mô tả ở đây còn được đề xuất bao gồm nuôi cấy tế bào chủ dưới các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể mong muốn và thu hồi kháng thể mong muốn từ môi trường nuôi cấy.

Vẫn theo khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến chế phẩm bao gồm kháng thể kháng CD79b như được mô tả ở đây, kết hợp với chất mang. Tuỳ ý, chất mang này là chất mang dược dụng.

Khía cạnh khác theo sáng chế là đề xuất việc sử dụng kháng thể kháng CD79b polypeptit như được mô tả ở đây, để sản xuất thuốc hữu ích trong điều trị tình trạng bệnh mà đáp ứng với kháng kháng CD79b polypeptit.

Khía cạnh khác theo sáng chế là chế phẩm bao gồm hỗn hợp các hợp chất có công thức I kháng thể-dược chất trong đó lượng dược chất trung bình/kháng thể là khoảng từ 2 đến 5 hoặc khoảng từ 3 đến 4.

Khía cạnh khác theo sáng chế là dược phẩm bao gồm hợp chất có công thức I ADC, hỗn hợp I ADC hoặc muối dược dụng hoặc solvat của chúng và chất pha loãng, chất mang hoặc tá dược dược dụng.

Khía cạnh khác đề xuất dược phẩm bao gồm hợp chất có công thức I ADC và hợp chất thứ hai có các đặc tính kháng bệnh ung thư hoặc hiệu quả điều trị khác.

Khía cạnh khác là phương pháp giết chết hoặc ức chế sự tăng sinh tế bào khối u hoặc tế bào ung thư bao gồm điều trị tế bào với lượng thể liên hợp kháng thể-dược chất có công thức I hoặc muối dược dụng hoặc solvat của chúng, có hiệu quả để giết chết hoặc ức chế sự tăng sinh tế bào khối u hoặc tế bào ung thư.

Khía cạnh khác là phương pháp điều trị bệnh ung thư bao gồm cho người bệnh dùng lượng có hiệu quả điều trị của dược phẩm bao gồm hợp chất có công thức I ADC.

Khía cạnh khác bao gồm vật phẩm sản xuất, nghĩa là, bao gồm thể liên hợp kháng thể-dược chất, vật chứa và gói chèn vào hoặc chất đánh dấu chỉ định điều trị.

Khía cạnh theo sáng chế là phương pháp sản xuất thể liên hợp kháng thể-dược chất có công thức I bao gồm các bước: (a) cho nhóm xystein được tạo ra phản ứng với kháng thể tạo ra xystein vơi chất phản ứng cầu liên kết để tạo thành chất trung gian kháng thể cầu liên kết Ab-L; và (b) cho Ab-L phản ứng với phần dược chất được hoạt hoá D; nhờ đó thể liên hợp kháng thể-dược chất được tạo thành; hoặc bao gồm các bước: (c) cho nhóm ưa nhân của phần dược chất phản ứng với chất phản ứng cầu liên kết để tạo thành chất trung gian dược chất-cầu liên kết D-L; và (d) cho D-L phản ứng với nhóm xystein được tạo ra của kháng thể tạo ra xystein; nhờ đó thể liên hợp kháng thể-dược chất được tạo thành.

Khía cạnh theo sáng chế là thử nghiệm phát hiện tế bào ung thư bao gồm: (a) cho tế bào tiếp xúc với thể liên hợp kháng thể-dược chất kháng CD79b xystein được sinh ra; và (b) xác định phạm vi gắn kết của thể liên hợp kháng thể-dược chất kháng CD79b xystein được tạo ra với với tế bào.

A. Các kháng thể kháng CD79b

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b mà có thể sử dụng ở đây làm chất điều trị. Các kháng thể ví dụ bao gồm các kháng thể đa dòng, đơn dòng, được làm thích hợp với người, đặc hiệu kép và liên hợp khác loại.

1. Các kháng thể đa dòng

Các kháng thể đa dòng tốt hơn là tạo ra ở động vật bởi nhiều lần tiêm dưới da (sc) hoặc trong bụng (ip) kháng nguyên và tá dược liên quan. Có thể sử dụng để tạo liên hợp kháng nguyên liên quan (đặc biệt là khi peptit tổng hợp được sử dụng) với protein mà là miễn dịch ở các loài sẽ được tạo miễn dịch. Ví dụ, kháng nguyên có thể được liên hợp với hemoxyanin lỗ khoá (KLH), albumin huyết thanh, thyroglobulin bò hoặc chất ức chế trypsin đậu tương, bằng cách sử dụng chất hai chức hoặc tạo dẫn xuất, ví dụ, maleimidobenzoyl sulfosucxinimit este (liên hợp thông qua các gốc xystein), N-hydroxysucxinimit (thông qua các gốc lysin), glutaraldehyt, sucxinic anhydrit, $SOCl_2$, hoặc $R^1N=C=NR$, trong đó R và R^1 là các nhóm alkyl khác nhau.

Động vật được tạo miễn dịch đối với kháng nguyên, các thể liên hợp miễn dịch hoặc các dẫn xuất bằng cách kết hợp, ví dụ, 100μg hoặc 5μg protein hoặc liên hợp (đối với thỏ hoặc chuột, tương ứng) với 3 thể tích của tá dược hoàn chỉnh Freund và tiêm trong da dung dịch ở nhiều vị trí. Một tháng sau đó, các động vật được tăng lên với từ 1/5 đến 1/10 lượng peptit ban đầu hoặc liên hợp trong tá dược hoàn chỉnh Freund bằng cách tiêm dưới da ở nhiều vị trí. Từ bảy đến 14 ngày sau đó, động vật được lấy máu và huyết thanh được thử nghiệm đối với độ chuẩn kháng thể. Các động vật được tăng lên cho đến độ chuẩn cao hơn. Các thể liên hợp cũng có thể được điều chế trong môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp. Ngoài ra, kết tụ các chất như phèn được sử dụng thích hợp để tăng cường đáp ứng miễn dịch.

2. Các kháng thể đơn dòng

Các kháng thể đơn dòng có thể được điều chế bằng cách sử dụng phương pháp lai lần đầu tiên được mô tả bởi Kohler et al., Nature, 256:495 (1975), hoặc có thể được điều chế bằng các phương pháp ADN tái tổ hợp (Bằng Mỹ số 4,816,567).

Trong phương pháp lai, động vật chủ là chuột hoặc động vật thích hợp khác, như chuột đồng, được tạo miễn dịch như được mô tả trên đây để tạo ra các tế bào bạch huyết mà tạo ra hoặc có khả năng tạo ra kháng thể mà sẽ gắn kết đặc hiệu với protein được sử để tạo miễn dịch. Theo cách khác, các tế bào bạch huyết có thể được tạo miễn dịch *in vitro*. Sau khi tạo miễn dịch, các tế bào bạch huyết được phân lập và sau đó được dung hợp với dòng tế bào myelin bằng cách sử dụng chất dung hợp thích hợp, như polyetylen glycol, để tạo thành tế bào lai (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)).

Các tế bào lai được tạo ra theo các này được tạo hạt và được phát triển trong môi trường nuôi cấy thích hợp mà tốt hơn là môi trường chứa một hoặc nhiều chất nền mà ức chế sự phát triển hoặc khả năng sống sót của các tế bào u tuỷ không được dung hợp, ban đầu (cũng được gọi là thành viên dung hợp). Ví dụ, nếu các tế bào u tuỷ ban đầu thiếu enzym hypoxanthin guanin phosphoribosyl transferaza (HGPRT hoặc HPRT), môi trường nuôi cấy chọn lọc đối với các thể lai sẽ thường bao gồm hypoxanthin, aminopterin, và thymidin (môi trường HAT), mà chất nền ngăn ngừa sự phát triển các tế bào thiếu HGPRT.

Các tế bào u tuỷ dung hợp được ưu tiên là các tế bào mà dung hợp hiệu quả, trợ giúp sản xuất kháng thể ở mức cao bởi các tế bào sản xuất kháng thể chọn lọc và nhạy với môi trường chọn lọc mà chọn lọc đối với các tế bào ban đầu không được dung hợp. Các dòng tế bào u tuỷ được ưu tiên là dòng tế bào myelin của chuột, như các dòng tế bào có nguồn gốc từ khối u của chuột MOPC-21 và MPC-11 hiện có từ Salk Institute Cell Distribution Center, San Diego, California USA, và SP-2 và các dẫn xuất ví dụ, các tế bào X63-Ag8-653 hiện có từ American Type Culture Collection, Manassas, Virginia, USA. Các dòng tế bào u tuỷ của người hoặc u tuỷ khác loại của chuột-người cũng đã được mô tả để sản xuất các kháng thể đơn dòng của người (Kozbor, J. Immunol., 133:3001 (1984); và Brodeur et al., kháng thể đơn dòng Production Techniques and Applications, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987)).

Môi trường nuôi cấy trong đó các tế bào lai đang phát triển để thử nghiệm sản xuất các kháng thể đơn dòng trực tiếp đối với kháng nguyên. Tốt hơn là, tính đặc hiệu

gắn kết của kháng thể đơn dòng được tạo ra bởi các tế bào lai được xác định bằng cách kết tủa miễn dịch hoặc bằng thử nghiệm gắn kết *in vitro*, như thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA) hoặc thử nghiệm hút bám miễn dịch liên kết enzym (ELISA).

Ái lực gắn kết của kháng thể đơn dòng có thể, ví dụ, được xác định bằng các phân tích Scatchard được mô tả trong Munson et al., Anal. Biochem., 107:220 (1980).

Khi các tế bào lai mà tạo ra kháng thể có tính đặc hiệu, ái lực và/hoặc hoạt tính mong muốn được nhận biết, các thể đơn dòng được tạo dưới đơn dòng bằng cách giới hạn các quy trình pha loãng và được phát triển bởi các phương pháp tiêu chuẩn (Goding, Monoclonal Antibodies: Principles and Practice, pp.59-103 (Academic Press, 1986)). Môi trường nuôi cấy thích hợp đối với mục đích này bao gồm, ví dụ, môi trường D-MEM hoặc RPMI-1640. Ngoài ra, các tế bào lai có thể được phát triển in vivo như các khối u asxit ở động vật, ví dụ, bằng cách tiêm trong bụng các tế bào vào chuột.

Các kháng thể đơn dòng được tiết bởi các dưới đơn dòng thích hợp được tách từ môi trường nuôi cấy, dịch lỏng asxit hoặc huyết thanh bằng các quy trình tinh chế kháng thể thông thường như, ví dụ, sắc ký ái lực (ví dụ, bằng cách sử dụng protein A hoặc protein G-Sepharose) hoặc sắc ký trao đổi ion, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách, v.v..

ADN mã hoá kháng thể đơn dòng được phân lập dễ dàng và được tạo trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng các đầu dò oligonucleotit mà có khả năng gắn kết đặc hiệu với gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể của chuột). Các tế bào lai như là nguồn được ưu tiên của ADN này. Khi được phân lập, ADN có thể được đặt vào các vectơ biểu hiện, mà sau đó được chuyển nhiễm vào tế bào chủ như các tế bào *E. coli*, các tế bào COS của khỉ, các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung quốc (CHO) hoặc các tế bào myelin mà mặt khác không tạo ra protein kháng thể, để thu được tổng hợp kháng thể đơn dòng trong tế bào chủ tái tổ hợp. Xem xét sự biểu hiện tái tổ hợp ở vi khuẩn chứa ADN mã hoá kháng thể bao gồm Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5:256-262 (1993) and Plückthun, Immunol. Revs. 130:151-188 (1992).

Theo phương án khác, các kháng thể đơn dòng hoặc mảnh kháng thể có thể được phân lập từ thư viện thể thực khuẩn kháng thể được sinh ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật được mô tả trong McCafferty et al., Nature, 348:552-554 (1990).

Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) and Marks et al., J. Mol. Biol., 222:581-597 (1991) mô tả việc phân lập các kháng thể của chuột và của người, tương ứng, bằng cách sử dụng các thư viện thể thực khuẩn. Các công bố sau đó mô tả việc sản xuất kháng thể của người ái lực cao (khoảng nM) bằng cách chuyển chuỗi (Marks et al., Bio/Technology, 10:779-783 (1992)), cũng như lây nhiễm tổ hợp và tái tổ hợp in vivo như kế hoạch để tạo cấu trúc các thư viện thể thực khuẩn rất lớn (Waterhouse et al., Nuc. Acids. Res. 21:2265-2266 (1993)). Do đó, các kỹ thuật này theo cách khác có thể tồn tại đối với các kỹ thuật lai kháng thể đơn dòng để phân lập các kháng thể đơn dòng.

ADN mà mã hoá kháng thể có thể được cải biến để sản xuất ra các polypeptit kháng thể khảm hoặc dung hợp, ví dụ, bằng cách thay thế các trình tự miền cố định chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của người (C_H và C_L) đối với các trình tự tương đồng của chuột (bằng Mỹ số 4,816,567; và Morrison, et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA, 81:6851 (1984)), hoặc bằng cách dung hợp với trình tự mã hoá globulin miễn dịch với tất cả hoặc một phần của trình tự mã háo đối với polypeptit không phải globulin miễn dịch (polypeptit khác loại). Các trình tự polypeptit không phải globulin miễn dịch có thể thay thế đối với các miền cố định của kháng thể hoặc chúng được thế đối với các miền biến đổi của vị trí kháng thể kết hợp kháng nguyên để tạo ra kháng thể khảm hoá trị hai bao gồm một vị trí kết hợp kháng nguyên khác có tính đặc hiệu đối với kháng nguyên khác.

3. Các kháng thể của người và được làm thích hợp với người

Các kháng thể kháng CD79b theo sáng chế còn có thể bao gồm các kháng thể được làm thích hợp với người hoặc kháng thể của người. Các dạng được làm thích hợp với người của kháng thể không phải của người (ví dụ, chuột) là các globulin miễn dịch khảm, các chuỗi globulin miễn dịch hoặc các mảnh của chúng (như Fv, Fab, Fab', $F(ab')_2$ hoặc các dưới trình tự kháng thể gắn kết kháng nguyên) mà chứa trình tự tối thiểu có nguồn gốc từ globulin miễn dịch không phải của người. Các kháng thể được làm thích hợp với người bao gồm các globulin miễn dịch của người (kháng thể nhận) trong đó các gốc từ vùng quyết định bổ sung (CDR) của kháng thể nhận được thay thế bằng các gốc CDR của các loài không phải của người (kháng thể cho) như chuột đồng, chuột nhà hoặc thỏ có tính đặc hiệu, ái lực và khả năng mong muốn. Trong một số trường hợp, các gốc khung Fv của globulin miễn dịch của người được thay thế bằng các gốc tương ứng không phải của người. Các kháng thể được làm thích hợp với người

cũng có thể bao gồm mà được tìm thấy không phải ở kháng thể nhận và cũng không phải trình tự CDR ngoại nhập hoặc khung. Thông thường, kháng thể được làm thích hợp với người sẽ bao gồm về căn bản là tất cả ít nhất là một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc về căn bản là tất cả các vùng CDR tương ứng với các vùng của globulin miễn dịch không phải của người và tất cả hoặc về căn bản là tất cả các vùng FR là các vùgn của trình tự liên ứng globulin miễn dịch của người. kháng thể được làm thích hợp với người cũng tốt nhất là sẽ bao gồm ít nhất một phần vùng cố định globulin miễn dịch (Fc), thường là globulin miễn dịch của người [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-329 (1988); và Presta, Curr. Op. Cấu trúc. Biol., 2:593-596 (1992)].

Các phương pháp nhân hoá các kháng thể không phải của người là đã biết trong lĩnh vực này. Thông thường, kháng thể được làm thích hợp với người có một hoặc nhiều gốc axit amin được đưa vào nó từ nguồn mà không phải của người. Các gốc axit amin không phải của người thường được gọi là các gốc "nhập khẩu", mà thường được lấy từ miền biến đổi "nhập khẩu". Việc nhân hoá có thể được thực hiện về căn bản là theo phương pháp của Winter và cộng sự [Jones et al., Nature, 321:522-525 (1986); Riechmann et al., Nature, 332:323-327 (1988); Verhoeyen et al., Science, 239:1534-1536 (1988)], bằng cách thay thế các trình tự CDR hoặc CDR của bộ gặm nhấm đối với trình tự tương ứng của kháng thể của người. Do đó, các kháng thể "được làm thích hợp với người" là các kháng thể khảm (bằng Mỹ số 4,816,567), trong đó về căn bản là ít miền biến đổi nguyên vẹn của người đã được thay thế bằng trình tự tương ứng từ các loài không phải của người. Thực tế, các kháng thể được làm thích hợp với người thường là các kháng thể của người trong đó một số gốc CDR và một số gốc FR có thể có được thế bằng cách gốc từ các vị trí tương ứng ở các kháng thể của bộ gặm nhấm.

Việc lựa chọn các miền biến đổi của người, cả chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, sẽ được sử dụng để sản xuất các kháng thể được làm thích hợp với người là rất quan trọng để giảm tính kháng nguyên và đáp ứng HAMA (kháng thể của người kháng chuột) khi kháng thể này nhằm mục đích sử dụng để điều trị cho người. Việc khử hoặc loại bỏ đáp ứng HAMA là đáng kể liên quan đến sự phát triển lâm sàng các chất điều trị thích hợp. Xem, ví dụ, Khaxzaeli et al., J. Natl. Cancer Inst. (1988), 80:937; Jaffers et al., Transplantation (1986), 41:572; Shawler et al., J. Immunol. (1985), 135:1530; Sears et al., J. Biol. Response Mod. (1984), 3:138; Miller et al., Blood (1983), 62:988;

Hakimi et al., J. Immunol. (1991), 147:1352; Reichmann et al., Nature (1988), 332:323; Junghans et al., Cancer Res. (1990), 50:1495. Như được mô tả ở đây, sáng chế đề xuất kháng thể mà được làm thích hợp với người sao cho đáp ứng HAMA được khử hoặc loại bỏ. Các biến thể của các kháng thể này còn có thể thu được bằng cách sử dụng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, một số trong số chúng còn được mô tả dưới đây. Theo phương pháp được gọi là "thích hợp nhất", trình tự của miền biến đổi của kháng thể của bộ gặm nhấm được sàng lọc đối với toàn bộ thư viện của các trình tự miền biến đổi đã biết của người. Trình tự của miền biến đổi của người V là gần nhất với trình tự của bộ gặm nhấm được nhận biết và vùng khung của người (FR) trong nó được chấp nhận đối với kháng thể được làm thích hợp với người (Sims et al., J. Immunol. 151:2296 (1993); Chothia et al., J. Mol. Biol., 196:901 (1987)). Phương pháp khác sử dụng vùng khung cụ thể có nguồn gốc từ trình tự liên ứng của tất cả kháng thể của người của phân nhóm cụ thể của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. Khung tương tự có thể được sử dụng cho một vài kháng thể được làm thích hợp với người khác nhau (Carter et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:4285 (1992); Presta et al., J. Immunol. 151:2623 (1993)).

Ví dụ, trình tự axit amin từ kháng thể như được mô tả ở đây có thể có tác dụng như trình tự khởi đầu (ban đầu) để tạo đa dạng hoá (các) trình tự khung và/hoặc siêu biến. Trình tự khung được chọn mà tạo đích trình tự siêu biến khởi đầu được liên kết được đề cập ở đây làm khung nhận của người. Trong khi các khung nhận của người có thể là từ hoặc có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của người (các vùng VL và/hoặc VH của chúng), tốt hơn là các khung nhận của người là từ hoặc có nguồn gốc từ, trình tự khung liên ứng của người như các khung đã được chứng minh có tính miễn dịch tối thiểu hoặc không có miễn dịch ở người bệnh.

Trong đó thụ thể có nguồn gốc từ globulin miễn dịch của người, có thể chọn lọc tuỳ ý trình tự khung của người mà được chọn dựa trên tính tương đồng của nó với trình tự khung cho bằng cách sắp xếp trình tự khung cho với các trình tự khung của người khác nhau theo sự lựa chọn trình tự khung của người và lựa chọn trình tự khung tương đồng nhất làm trình tự nhận.

Theo một phương án, các khung liên ứng của người ở đây là từ hoặc có nguồn gốc từ trình trình tự khung liên ứng phân nhóm III VH và/hoặc phân nhóm I VL kappa.

Do đó, khung nhận của người VH có thể bao gồm một, hai, ba hoặc tất cả trình tự khung sau đây:

FR1 bao gồm EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143),

FR2 bao gồm WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144),

FR3 bao gồm FR3 bao gồm RFTISX$_1$DX$_2$SKNTX$_3$YLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 147), trong đó X$_1$ là A hoặc R, X$_2$ là T hoặc N, và X$_3$ là A hoặc L,

FR4 bao gồm WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

Các ví dụ về các khung liên ứng VH bao gồm:

khung liên ứng phân nhóm I VH của người trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 108);

khung liên ứng phân nhóm I VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOs: 109-111);

khung liên ứng phân nhóm II VH của người trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 112);

khung liên ứng phân nhóm II VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOs: 113-115);

khung liên ứng phân nhóm III VH của người trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 116);

khung liên ứng phân nhóm III VH của người trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NO: 117-119);

khung nhận của người VH trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 120);

khung nhận của người VH trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOs: 121-122);

khung nhận của người VH 2 trừ đi Kabat CDRs (SEQ ID NO: 123); hoặc

khung nhận của người VH 2 trừ đi các vùng siêu biến kéo dài (SEQ ID NOs: 124-126).

Theo một phương án, khung liên ứng nhận của người VH bao gồm, một, hai, ba hoặc tất cả các trình tự khung sau đây:

FR1 bao gồm EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 143),

FR2 bao gồm WVRQAPGKGLEWV (SEQ ID NO: 144),

FR3 bao gồm RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 145),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA (SEQ ID NO: 148),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR (SEQ ID NO: 149),

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS (SEQ ID NO: 150), hoặc

RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR (SEQ ID NO: 151)

FR4 bao gồm WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 146).

Khung nhận của người VL có thể bao gồm một, hai, ba hoặc tất cả trình tự khung sau đây:

FR1 bao gồm DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 139),

FR2 bao gồm WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 140),

FR3 bao gồm GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 141),

FR4 bao gồm FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 142).

Các ví dụ về khung liên ứng VL bao gồm:

khung liên ứng phân nhóm I VL kapa của người (SEQ ID NO: 127);

khung liên ứng phân nhóm II VL kapa của người (SEQ ID NO: 128);

khung liên ứng phân nhóm III VL kapa của người (SEQ ID NO: 129); hoặc

khung liên ứng phân nhóm IV VL kapa của người (SEQ ID NO: 130)

Trong khi trình tự nhận có thể là giống với trình tự với trình tự khung của người được chọn, liệu rằng mà từ globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, sáng chế đề cập đến trình tự nhận có thể bao gồm các thay thế axit amin tồn tại trước liên quan đến trình tự globulin miễn dịch của người hoặc trình tự khung liên ứng của người. Các thay thế đang tồn tại trước tốt hơn là của người, thường là bốn, ba, hai hoặc một axit amino khác nhau chỉ liên quan đến trình tự globulin miễn dịch của người hoặc trình tự khung liên ứng.

Các gốc vùng siêu biến của kháng thể không phải của người được kết hợp vào các khung nhận của người VL và/hoặc VH. Ví dụ, có thể kết hợp các gốc tương ứng với các gốc Kabat CDR, các gốc vòng siêu biến Chothia, các gốc Abm và/hoặc các gốc tiếp xúc. Tuỳ ý, các gốc vùng siêu biến kéo dài như sau được kết hợp vào: 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3), 26-35B (H1), 50-65, 47-65 hoặc 49-65 (H2) và 93-102, 94-102, hoặc 95-102 (H3).

Trong khi "kết hợp" các gốc vùng siêu biến được mô tả ở đây, sẽ thích hợp rằng điều này có thể đạt được theo các cách khác nhau, ví dụ, axit nucleic mã hoá trình tự axit amin mong muốn có thể được tạo ra bằng cách tạo đột biến axit nucleic mã hoá trình tự miền biến đổi của chuột sao cho các gốc khung của chúng được thay đổi thành các gốc khung nhận của người hoặc bằng cách tạo đột biến axit nucleic mã hoá trình tự biến đổi của người sao cho các gốc miền siêu biến được thay đổi thành các gốc không phải của người hoặc bằng cách tổng hợp axit nucleic mã hoá trình tự mong muốn, v.v..

Trong các ví dụ ở đây, các biến thể được ghép vùng siêu biến được tạo ra bởi đột biến gen Kunkel axit nucleic mã hoá trình tự nhận của người, bằng cách sử dụng oligonucleotit riêng rẽ đối với mỗi vùng siêu biến. Kunkel *et al., Methods Enzymol.* 154:367-382 (1987). Các thay đổi thích hợp có thể được đưa vào trong khung và/hoặc vùng siêu biến, bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường, để hiệu chỉnh và thiết lập lại các tương tác kháng nguyên-vùng siêu biến thích hợp.

Thể hiện thể thực khuẩn (cũng được gọi ở đây là thể hiện thể thực khuẩn trong một số trường hợp) có thể được sử dụng như phương pháp thông thường và nhanh chóng để tạo ra và sàng lọc nhiều kháng thể biến thể hiệu lực khác nhau trong thư viện được tạo ra bởi sự ngẫu nhiên hoá trình tự. Tuy nhiên, các phương pháp khác để sản xuất và sàng lọc kháng thể khác nhau là hiện đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

Kỹ thuật thể hiện thể thực khuẩn đã tạo ra công cụ hiệu lực để tạo ra và chọn lọc protein mới mà gắn kết với phối tử, như kháng nguyên. bằng cách sử dụng các kỹ thuật thể hiện thể thực khuẩn cho phép tạo ra thư viện lớn biến thể protein mà có thể được phân loại nhanh chóng đối với các trình tự này mà gắn kết với phân tử đích với ái lực cao. Các axit nucleic mã hoá polypeptit biến thể thường được dung hợp với trình tự axit nucleic mã hoá protein bọc ngoài vi rút như gen III protein hoặc gen VIII protein. Các hệ thể hiện thể thực khuẩn trong đó trình tự axit nucleic mã hoá protein hoặc polypeptit là được dung hợp với trình tự axit nucleic mã hoá phần gen III protein đã được phát triển. (Bass, S., *Proteins,* 8:309 (1990); Lowman and Wells, *Methods: A Companion to Methods in Enzymology,* 3:205 (1991)). Hệ thể hiện thể thực khuẩn hoá trị một, dung hợp gen được biểu hiện ở các mức thấp và gen III protein kiểu dại cũng được biểu hiện sao cho tính lây nhiễm hạt được duy trì. Các phương pháp tạo ra thư viện peptit và sàng lọc thư viện này đã được mô tả trong nhiều bằng sáng chế (ví dụ bằng Mỹ số 5,723,286, bằng Mỹ số 5,432, 018, bằng Mỹ số 5,580,717, bằng Mỹ số 5,427,908 và bằng Mỹ số 5,498,530).

Các thư viện kháng thể hoặc polypeptit gắn kết kháng nguyên đã được tạo ra theo nhiều cách bao gồm bằng cách thay đổi gen đơn bằng cách lồng trình tự ADN ngẫu nhiên hoặc bằng cách tạo đơn dòng họ gen liên quan. Các phương pháp thể hiện kháng thể hoặc mảnh gắn kết kháng nguyên bằng cách sử dụng thể hiện thể thực khuẩn đã được mô tả trong các bằng Mỹ số 5,750,373, 5,733,743, 5,837,242,

5,969,108, 6,172,197, 5,580,717, và 5,658,727. Thư viện này sau đó được sàng lọc để biểu hiện kháng thể hoặc protein gắn kết kháng nguyên với các đặc tính mong muốn.

Phương pháp thay thế axit amin lựa chọn vào axit nucleic khung là đã được biết trong lĩnh vực này, một trong số chúng được mô tả ở đây. Ví dụ, các gốc vùng siêu biến có thể được thế bằng cách sử dụng phương pháp Kunkel. Xem, ví dụ, Kunkel *et al., Methods Enzymol*. 154:367-382 (1987).

Trình tự oligonucleotit bao gồm một hoặc nhiều bộ mã bộ ba được xác định đối với các gốc vùng siêu biến sẽ được thay đổi. Bộ mã bộ ba là mộ trình tự bộ ba nucleotit khác nhau được sử dụng để mã hoá các axit amin biến thể mong muốn. Các bộ mã bộ ba có thể được thể hiện bằng cách sử dụng các biểu tượng để xác định các nucleotit cụ thể hoặc hỗn hợp đẳng mol của nucleotit như được thể hiện theo mã IUB dưới đây.

Mã IUB

G Guanin

A Adenin

T Thymin

C Xytosin

R (A hoặc G)

Y (C hoặc T)

M (A hoặc C)

K (G hoặc T)

S (C hoặc G)

W (A hoặc T)

H (A hoặc C hoặc T)

B (C hoặc G hoặc T)

V (A hoặc C hoặc G)

D (A hoặc G hoặc T) H

N (A hoặc C hoặc G hoặc T)

Ví dụ, bộ mã bộ ba DVK, D có thể là các nucleotit A hoặc G hoặc T; V có thể là A hoặc G hoặc C; và K có thể là G hoặc T. Bộ mã bộ ba này có thể có 18 mã bộ ba khác nhau và có thể mã hoá các axit amin Ala, Trp, Tyr, Lys, Thr, Asn, Lys, Ser, Arg, Asp, Glu, Gly, và Cys.

Các bộ oligonucleotit hoặc mồi có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn. Bộ oligonucleotit có thể được tổng hợp, ví dụ, bằng cách tổng hợp pha rắn, chứa các trình tự mà thể hiện tất cả các kết hợp có thể có của các bộ ba nucleotit được tạo ra bởi bộ mã bộ ba và sẽ mã hoá nhóm axit amin mong muốn. Việc tổng hợp các oligonucleotit với "thoái biến" nucleotit chọn lọc ở một só vị trí là đã biết trong lĩnh vực này. Các bộ nucleotit này có một số bộ mã bộ ba có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng các chất tổng hợp axit nucleic hiện có bán trên thị trường (hiện có của, ví dụ, Applied Biosystems, Foster City, CA) hoặc có thể thu được trên thị trường (ví dụ, từ Life Technologies, Rockville, MD). Do đó, bộ oligonucleotit được tổng hợp có bộ mã bộ ba cụ thể sẽ thường bao gồm nhiều oligonucleotit với các trình tự khác nhau, sự khác nhau được thiết lập bởi bộ mã bộ ba trong toàn bộ trình tự. Các oligonucleotit, như được sử dụng theo sáng chế, có các trình tự mà cho phép lai với mẫu axit nucleic miền biến đổi và cũng có thể bao gồm các vị trí enzym giới hạn cho mục đích tạo đơn dòng.

Theo một phương pháp, các trình tự axit nucleic mã hoá các axit amin biến thể có thể được tạo ra bởi các đột biến gen qua trung gian oligonucleotit. Kỹ thuật này đã được biết trong lĩnh vực này như được mô tả bởi Zoller *et al. Nucleic Acids Res.* 10:6487-6504(1987). Một cách vắn tắt, trình tự axit nucleic mã hoá các axit amin biến thể được tạo ra bằng cách lai bộ oligonucleotit mã hoá các bộ mã bộ ba mong muốn với mẫu ADN, trong đó mẫu này là dạng sợi đơn của plasmit chứa trình tự mẫu axit nucleic vùng biến đổi. Sau khi lai, ADN polymeraza được sử dụng để tổng hợp toàn bộ sợi bổ sung thứ hai của mẫu mà do đó sẽ kết hợp đoạn mồi oligonucleotit và sẽ chứa các bộ mã bộ ba như được toạ ra bởi bộ oligonucleotit.

Thông thường, các oligonucleotit chứa ít nhất là 25 nucleotit theo chiều dài là được sử dụng. Oligonucleotit tối ưu sẽ có từ 12 đến 15 nucleotit mà bổ sung hoàn toàn vào mẫu trên một phía của (các) nucleotit mã hoá (các) đột biến. Điều này chắc chắn rằng oligonucleotit sẽ lai đúng với phân tử mẫu ADN sợi đơn. Các oligonucleotit được tổng hợp dễ dàng bằng cách sử dụng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này như được mô tả bởi Crea et al., *Proc. Nat'l. Acad. Sci. USA*, 75:5765 (1978).

Mẫu ADN được tạo ra bởi các vectơ mà có nguồn gốc từ các vectơ thể thực khuẩn M13 (hiện có bán trên thị trường các vectơ M13mp18 và M13mp19 là thích hợp) hoặc các vectơ mà có điểm khởi đầu sao chép thể thực khuẩn sợi đơn như được

mô tả bởi Viera *et al.*, *Meth. Enzymol.,* 153:3 (1987). Do đó, ADN sẽ được đột biến có thể được chèn vào một trong các vectơ này để tạo ra mẫu sợi đơn. Việc sản xuất mẫu sợi đơn được mô tả trong các phần 4.21-4.41 của Sambrook *et al.* trên đây.

Để làm thay đổi trình tự ADN nguyên gốc, oligonucleotit được lai với mẫu sợi đơn dưới các điều kiện lai thích hợp. Enzym polyme hoá ADN, thường là T7 ADN polymeraza hoặc mảnh Klenow của ADN polymeraza I, sau đó được bổ sung vào để tổng hợp sợi bổ sung của mẫu bằng cách sử dụng oligonucleotit làm mồi để tổng hợp. Phân tử phức kép khác loại do đó được tạo thành sao cho một sợi ADN mã hoá dạng gen 1 đột biến và sợi khác (mẫu ban đầu) mã hoá trình tự gen 1 nguyên gốc, không biến đổi. Phân tử phức kép khác loại sau đó được biến nạp vào tế bào chủ thích hợp, thường là sinh vật chưa có nhân điển hình như *E. coli* JM101. Sau khi phát triển tế bào, chúng được đặt lên đĩa agaroza và sàng lọc bằng cách sử dụng gen mồi oligonucleotit được đánh dấu phóng xạ với 32-Phosphat để nhận biết các khuẩn lạc vi khuẩn mà chứa ADN đột biến.

Phương pháp được mô tả ngay trên đây có thể được cải biến sao cho phân tử kép tương đồng được tạo ra trong đó các sợi của plasmit chứa (các) đột biến. Các cải biến này là như sau: oligonucleotit sợi đơn được aneal với mẫu sợi đơn như được mô tả trên đây. Hỗn hợp gồm ba deoxyribonucleotit, deoxyriboadenosin (dATP), deoxyriboguanosin (dGTP), và deoxyribothymidin (dTT), được kết hợp với thiodeoxyriboxytosin được cải biến được gọi là dCTP-(aS) (mà có thể thu được từ Amersham). Hỗn hợp này được bổ sung vào phức kép khung-oligonucleotit. Ngay khi bổ sung ADN polymeraza vào hỗn hợp này, sợi ADN giống với mẫu ngoại trừ các bazơ đột biến là được tạo ra. Ngoài ra, sợi ADN mới này sẽ chứa dCTP-(aS) thay vì dCTP, mà có tác dụng bảo vệ nó khỏi tiêu hoá endonucleaza giới hạn. Sau đó, sợi mẫu của phức khác loại sợi kép được cắt với enzym giới hạn thích hợp, sợi mẫu có thể được tiêu hoá với ExoIII nucleaza hoặc nucleaza thích hợp khác trước vùng chứa (các) vị trí sẽ bị đột biến gen. Sau đó, làm ngừng phản ứng để lại phân tử mà chỉ có một phần sợi đơn. Phức kép tương dồng ADN sợi kép hoàn toàn sau đó được tạo thành bằng cách sử dụng ADN polymeraza với sự có mặt của tất cả bốn deoxyribonucleotit triphosphat, ATP, và ADN ligaza. Phân tử phức kép tương đồng này sau đó có thể được biến nạp vào tế bào chủ thích hợp.

Như được nêu trên đây, trình tự của bộ oligonucleotit là chiều dài đầy đủ để lai axit nucleotit khung và cũng có thể là, nhưng không cần thiết, chứa các vị trí giới hạn. Mẫu ADN có thể được tạo ra bằng các vectơ mà có nguồn gốc từ các tectơ thể thực khuẩn M13 hoặc vectơ chứa điểm khởi đầu sao chép thể thực khuẩn sợi đơn như được mô tả bởi Viera *et al. Meth. Enzymol.*, 153:3 (1987). Do đó, ADN được làm biến đổi phải được chèn vào một trong các vectơ này để tạo ra mẫu sợi đơn. Sản xuất mẫu sợi đơn được mô tả trong các phần 4.21-4.41 của Sambrook *et al., nêu trên.*

Theo phương pháp khác, gắn kết kháng nguyên được khôi phục trong thời gian nhân hoá kháng thể thông qua việc chọn lọc các vùng siêu biến được phục hồi (Xem đơn sáng chế số 11/061,841, nộp ngày 18/2/2005). Phương pháp này bao gồm kết hợp các vùng siêu biến không phải của người vào khung nhận và còn đưa một hoặc nhiều thay thế axit amin vào một hoặc nhiều vùng siêu biến mà không cải biến trình tự khung thụ thể. Theo cách khác, việc đưa một hoặc nhiều thay thế axit amin có thể được kết thúc bởi các cải biến trong trình tự khung nhận.

Theo phương pháp khác, thư viện được sinh ra bằng cách tạo ra bộ oligonucleotit ngược dòng và xuôi dòng, mỗi bộ có nhiều oligonucleotit với các trình tự khácn hau, các trình tự khác nhau này được thiết lập bởi các bộ mã bộ ba được tạo ra trong trình tự của oligonucleotit. Các bộ oligonucleotit ngược dòng và xuôi dòng, cùng với trình tự axit nucleic mẫu miền biến đổi, có thể được sử dụng trong phản ứng chuỗi polymeraza để tạo ra "thư viện" sản phẩm PCR. Các sản phẩm PCR có thể được gọi là "các cát xét axit nucleic", do chúng có thể dược dung hợp với các trình tự axit nucleic liên quan hoặc không liên quan khác, ví dụ, protein bọc ngoài vi rút và các miền dime hoá, bằng cách sử dụng các kỹ thuật sinh học phân tử được thiết lập.

Trình tự của các gen mồi PCR bao gồm một hoặc nhiều bộ mã bộ ba được xác định để tiếp cận dung môi và các vị trí khác nhau ở mức cao ở vùng siêu biến. Như được mô tả trên đây, bộ mã bộ ba là bộ trình tự bậc ba nucleotit khác nhau được sử dụng để mã hoá các axit amin biến thể mong muốn.

Khả năng chọn lọc kháng thể mà đáp ứng các tiêu chuẩn mong muốn, như được chọn thông qua các bước sàng lọc/chọn lọc thích hợp có thể được phân lập và tạo đơn dòng bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp tiêu chuẩn.

Còn quan trọng rằng các kháng thể được làm thích hợp với người với việc duy trì ái lực gắn kết cao đối với kháng nguyên và các đặc tính sinh học thích hợp khác. Để

đạt được mục đích này, theo phương pháp được ưu tiên, các kháng thể được làm thích hợp với người được điều chế bằng quy trình phân tích trình tự ban đầu và các sản phẩm được làm thích hợp với người khác nhau bằng cách sử dụng các mô hình ba chiều của các trình tự ban đầu và được làm thích hợp với người. Các mô hình globulin miễn dịch ba chiều hiện có phổ biến và đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các chương trình máy tính hiện có mà minh hoạ và thể hiện các cấu trúc cấu hình ba chiều có thể có của các trình tự globulin miễn dịch quan tâm được chọn lọc. Việc thẩm định thể hiện này cho phép phân tích vai trò tương tự của các gốc theo chức năng của trình tự globulin miễn dịch quan tâm, nghĩa là, phân tích các gốc mà tác động đến khả năng của globulin miễn dịch để gắn kết kháng nguyên của nó. Theo cách này, các gốc FR có thể được chọn và kết hợp từ các trình tự nhận và trình tự nhập khẩu sao cho các đặc tính kháng thể mong muốn, như ái lực gia tăng đối với (các) kháng nguyên đích, là đạt được. Thông thường, các gốc của vùng siêu biến trực tiếp và về căn bản là liên quan đến việc tác động gắn kết kháng nguyên.

Các dạng khác nhau của kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người là được dự định. Ví dụ, kháng thể được làm thích hợp với người có thể là mảnh kháng thể, như Fab, mà tuỳ ý được liên hợp với một hoặc nhiều chất độc tế bào để sinh ra liên hợp miễn dịch. Theo cách khác, kháng thể được làm thích hợp với người có thể là kháng thể nguyên vẹn, như kháng thể nguyên vẹn IgG1.

Theo cách khác với nhân hoá, các kháng thể của người có thể được sinh ra. Ví dụ, hiện có thể tạo ra các động vật chuyển gen (ví dụ, chuột) mà có khả năng, ngay khi tạo miễn dịch, tạo ra kho kháng thể của người với sự không có mặt của việc sản xuất globulin miễn dịch nội sinh. Ví dụ, đã được mô tả rằng việc loại bỏ đồng nhất gen vùng kết hợp chuỗi nặng kháng thể (J_H) và chuột đột biến dòng mầm dẫn đến ức chế hoàn toàn sản xuất kháng thể nội sinh. Việc chuyển dãy gen globulin miễn dịch dòng mầm của người vào chuột đột biến dòng mầu này sẽ dẫn đến sản xuất các kháng thể của người ngay quyết định kháng nguyên. Xem, ví dụ, Jakobovits et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90:2551 (1993); Jakobovits et al., Nature, 362:255-258 (1993); Bruggemann et al., Year in Immuno. 7:33 (1993); các bằng Mỹ số 5,545,806, 5,569,825, 5,591,669 (tất cả của GenPharm); 5,545,807; và WO 97/17852.

Theo cách khác, kỹ thuật thể hiện thể thực khuẩn (McCafferty et al., Nature 348:552-553 [1990]) có thể được sử dụng để tạo ra các kháng thể của người và mảnh

kháng thể *in vitro*, từ kho gen miền biến đổi globulin miễn dịch (V) từ người cho không được tạo miễn dịch. Theo kỹ thuật này, các gen miền biến đổi V của kháng thể được tạo đơn dòng theo khung vào gen protein bao ngoài lớn hoặc nhỏ của thể thực khuẩn dạng sợi, như M13 hoặc fd, và được thể hiện là mảnh kháng thể chức năng trên bề mặt của hạt thể thực khuẩn. Bởi vì hạt dạng sợi chứa bản sao ADN sợi đơn của hệ gen thể thực khuẩn, việc chọn lọc dựa trên các đặc tính chức năng của kháng thể cũng dẫn đến chọn lọc gen mã hoá kháng thể thể hiện các đặc tính này. Do đó, một số đặc tính mô phỏng thể thực khuẩn của tế bào B. Thể hiện thể thực khuẩn có thể được thực hiện theo nhiều dạng, được xem xét trong, ví dụ, Johnson, Kevin S. and Chiswell, David J., Current Opinion in Cấu trúcural Biology 3:564-571 (1993). Một vài nguồn mảnh gen V có thể được sử dụng để thể hiện thể thực khuẩn. Clackson et al., Nature, 352:624-628 (1991) được phân lập dãy ngược của các kháng thể kháng oxazolon từ thư viện tổ hợp ngẫu nhiên nhỏ của gen V có nguồn gốc từ lá lách của chuột được tạo miễn dịch. Kho gen V từ kháng thể cho của người không được tạo miễn dịch có thể được tạo cấu trúc và các kháng thể đảo ngược dãy kháng nguyên (bao gồm tự bản thân kháng nguyên) có thể được phân lập theo các kỹ thuật được mô tả bởi Marks et al., J. Mol. Biol. 222:581-597 (1991), hoặc Griffith et al., EMBO J. 12:725-734 (1993). Cũng xem các bằng Mỹ số 5,565,332 và 5,573,905.

Như được mô tả trên đây, các kháng thể của người cũng có thể được sinh ra bởi các tế bào B hoạt hoá *in vitro* (xem các bằng Mỹ số 5,567,610 và 5,229,275).

4. Mảnh kháng thể

Theo một số trường hợp, có thuận lợi bằng cách sử dụng mảnh kháng thể, tốt hơn là toàn bộ kháng thể. Cỡ mảnh nhỏ hơn cho phép làm rõ ràng nhanh hơn và có thể dẫn đến đường vào khối u rắn được cải thiện.

Các kỹ thuật khác nhau đã được phát triển để sản xuất mảnh kháng thể. Theo cách truyền thống, các mảnh này có nguồn gốc thông qua tiêu hoá protein phân giải các kháng thể nguyên vẹn (xem, ví dụ, Morimoto et al., Journal of Biochemical and Biophysical Methods 24:107-117 (1992); và Brennan et al., Science, 229:81 (1985)). Tuy nhiên, các mảnh này hiện đã được tạo ra trực tiếp hoặc bằng các tế bào chủ tái tổ hợp. Các mảnh kháng thể Fab, Fv và ScFv có thể tất cả được biểu hiện và được tiết từ *E. coli*, do đó cho phép sản xuất dễ dàng lượng lớn mảnh này. Mảnh kháng thể có thể được phân lập từ các thư viện thể thực khuẩn kháng thể được mô tả trên đây. Theo

cách khác, các mảnh Fab'-SH có thể được thu hồi trực tiếp từ *E. coli* và được cặp đôi hoá học để tạo thành các mảnh $F(ab')_2$ (Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992)). Theo phương pháp khác, các mảnh $F(ab')_2$ có thể được phân lập trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tế bào chủ tái tổ hợp. Mảnh kháng thể Fab và $F(ab')_2$ với nửa chu kỳ phân rã gia tăng in vivo bao gồm các gốc epitop gắn kết thụ thể an toàn được mô tả trong bằng Mỹ số 5,869,046. Các kỹ thuật khác để sản xuất mảnh kháng thể sẽ được biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Theo phương án khác, kháng thể lựa chọn là mảnh Fv chuỗi đơn (scFv). Xem WO 93/16185; bằng Mỹ số 5,571,894; và bằng Mỹ số 5,587,458. Fv và sFv chỉ là các loài với các vị trí kết hợp nguyên vẹn mà không có các vùng cố định; do đó, chúng là thích hợp để gắn kết không đặc hiệu giảm trong khi sử dụng in vivo. Protein dung hợp sFv có thể được tạo cấu trúc để thu được dung hợp protein phản ứng kích thích ở đầu tận cùng amino hoặc carboxy của sFv. Xem Antibody Engineering, ed. Borrebaeck, nêu trên. Mảnh kháng thể cũng có thể là "kháng thể tuyến tính", ví dụ, như được mô tả trong bằng Mỹ số 5,641,870 chẳng hạn. Mảnh kháng thể tuyến tính này có thể là đơn đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép.

5. Các kháng thể đặc hiệu kép

Các kháng thể đặc hiệu kép là các kháng thể mà có tính đặc hiệu gắn kết đối với ít nhất là hai epitop khác nhau. Các kháng thể đặc hiệu kép mẫu có thể gắn kết với hai epitop khác nhau của CD79b protein như được mô tả ở đây. Các kháng thể khác có thể kết hợp vị trí gắn kết CD79b với vị trí gắn kết đối với protein khác. Theo cách khác, đích kháng CD79b có thể được kết hợp với đích mà gắn kết với phân tử kích thích trên tế bào bạch cầu như phân tử thụ thể tế bào T (ví dụ CD3), hoặc các thụ thể Fc đối với IgG (FcγR), như FcγRI (CD64), FcγRII (CD32) và FcγRIII (CD16), để tạo đích và định vị các cơ chế bảo vệ tế bào với tế bào biểu hiện CD79b. Các kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để định vị các chất độc tế bào với tế bào mà biểu hiện CD79b. Các kháng thể này có đích gắn kết CD79b và đích mà gắn kết chất độc tế bào (ví dụ, saporin, kháng interferon-α, vinca alkaloit, chuỗi rixin A, methotrexat hoặc chất đồng vị phóng xạ). Các kháng thể đặc hiệu kép có thể được điều chế như toàn bộ chiều dài kháng thể hoặc mảnh kháng thể (ví dụ, $F(ab')_2$ các kháng thể đặc hiệu kép).

WO 96/16673 mô tả kháng thể đặc hiệu kép kháng ErbB2/kháng FcγRIII và bằng Mỹ số 5,837,234 mô tả kháng thể đặc hiệu kép kháng ErbB2/kháng FcγRI. kháng

thể đặc hiệu kép kháng ErbB2/Fcα là được thể hiện trong WO98/02463. bằng Mỹ số 5,821,337 bộc lộ kháng thể đặc hiệu kép kháng ErbB2/kháng CD3.

Các phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép là đã biết trong lĩnh vực này. Sản xuất truyền thống toàn bộ chiều dài kháng thể đặc hiệu kép là dựa trên sự cùng biểu hiện của hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, trong đó hai chuỗi này có các tính đặc hiệu khác nhau (Millstein et al., Nature 305:537-539 (1983)). Bởi vì việc sắp xếp ngẫu nhiên các chuỗi nặng và chuỗi nhẹ globulin miễn dịch, các thể lai (quadromas) tạo ra hỗn hợp tiềm năng của 10 phân tử kháng thể khác nhau, mà chỉ có một có cấu trúc đặc hiệu kép chính xác. Việc tinh chế phân tử chính xác, mà thường được thực hiện bằng các bước sắc ký ái lực, là phức tạp hơn và hiệu xuất sản phẩm là thấp hơn. Quy trình tương tự được bộc lộ trong WO 93/08829, và trong Traunecker et al., EMBO J. 10:3655-3659 (1991).

Theo phương pháp khác nhau, các miền biến đổi kháng thể với các tính đặc hiệu gắn kết mong muốn (các vị trí kết hợp kháng nguyên-kháng thể) được dung hợp với các trình tự của miền cố định globulin miễn dịch. Tốt hơn là, dung hợp là với miền cố định chuỗi nặng Ig, bao gồm ít nhất là một phần của các vùng khung, C_H2, và C_H3. Đã được ưu tiên để có vùng cố định chuỗi nặng thứ nhất (C_H1) chứa vị trí cần thiết để gắn kết chuỗi nhẹ, có mặt trong ít nhất là một dung hợp. Các ADN mã hoá các dung hợp chuỗi nặng globulin và, nếu muốn, chuỗi nhẹ globulin, được chèn vào vectơ biểu hiện riêng rẽ, và cùng được chuyển nhiễm vào tế bào chủ thích hợp. Điều này tạo ra tính linh hoạt lớn hơn trong việc điều chỉnh các tỷ lệ đột biến của ba mảnh polypeptit theo các phương án khi các tỷ lệ không cân bằng của ba chuỗi polypeptit này được sử dụng trong cấu trúc tạo ra hiệu xuất tốt nhất của kháng thể đặc hiệu kép mong muốn. Tuy nhiên, có thể lồng các trình tự mã hoá đối hai hoặc tất cả ba chuỗi polypeptit vào vectơ biểu hiện đơn khi việc biểu hiện của ít nhất là hai chuỗi polypeptit với tỷ lệ cân bằng dẫn đến hiệu xuất cao khi các tỷ lệ này không có hiệu quả đáng kể đối với hiệu xuất kết hợp chuỗi mong muốn.

Theo phương án được ưu tiên của phương pháp này, các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm chuỗi nặng globulin miễn dịch lai với tính đặc hiệu gắn kết thứ nhất trong một đích, và cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ globulin miễn dịch lai (tạo ra tính đặc hiệu gắn kết thứ hai) trong đích khác. Đã phát hiện ra rằng cấu trúc không đối xứng tạo thuận lợi cho việc tách hợp chất đặc hiệu kép mong muốn từ các kết hợp chuỗi globulin miễn

dịch không mong muốn, nếu có mặt của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch chỉ trong một nửa phân tử đặc hiệu kép tạo thuận lợi để tách. Phương pháp này được bộc lộ trong WO 94/04690. Để chi tiết hơn về việc sinh ra kháng thể đặc hiệu kép xem, ví dụ, Suresh et al., Methods in Enzymology 121:210 (1986).

Theo phương pháp được mô tả trong bằng Mỹ số 5,731,168, bề mặt phân giới giữa cặp phân tử kháng thể có thể được tạo ra để tối đa hoá phần trăm heterodime mà được thu hồi từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp. Bề mặt phân giới được ưu tiên bao gồm ít nhất là một phần của miền C_H3. Trong phương pháp này, một hoặc nhiều chuỗi phụ axit amin nhỏ từ bề mặt chung của phân tử kháng thể thứ nhất được thay thế bằng chuỗi phụ lớn hơn (ví dụ, tyrosin hoặc tryptophan). "Khoang" bổ sung có cỡ giống nhau hoặc tương tự với (các) chuỗi phụ lớn được tạo ra trên bề mặt chung của phân tử kháng thể thứ hai bằng cách thay thế các chuỗi phụ axit amin lớn với chuỗi phụ axit amin nhỏ (ví dụ, alanin hoặc threonin). Điều này tạo ra cơ chế để gia tăng hiệu quả của heterodime trong sản phẩm phụ không mong muốn như homodime.

Các kháng thể đặc hiệu kép bao gồm các kháng thể liên kết ngang hoặc "liên hợp khác loại". Ví dụ, một trong số kháng thể này trong liên hợp khác loại có thể được cặp đôi với avidin, còn lại là với biotin. Các kháng thể này, ví dụ, đã được đề xuất để tạo đích các tế bào hệ miễn dịch với các tế bào không mong muốn (xem bằng Mỹ số 4,676,980), và để điều trị lây nhiễm HIV (WO 91/00360, WO 92/200373, và EP 03089). Các kháng thể liên hợp khác loại có thể được điều chế bằng cách sử dụng các phương pháp liên kết ngang thông thường. Các chất liên kết ngang thích hợp là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả trong bằng Mỹ số 4,676,980, cùng với nhiều kỹ thuật liên kết ngang.

Các kỹ thuật để sinh ra kháng thể đặc hiệu kép từ các mảnh kháng thể cũng đã được mô tả trong tài liệu chuyên ngành. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép có thể được điều chế bằng cách sử dụng liên kết hoá học. Brennan et al., Science 229:81 (1985) mô tả quy trình trong đó các kháng thể nguyên vẹn được phân tách bằng cách phân tách bằng cách phân huỷ protein để sinh ra các mảnh $F(ab')_2$. Các mảnh này được khử với sự có mặt của chất tạo phức dithiol, natri arsenua, để làm ổn định các dithiol lân cận và ngăn ngừa tạo thành disulfua nội phân tử. Các mảnh Fab' được sinh ra sau đó được chuyển hoá thành các dẫn xuất thionitrobenzoat (TNB). Một trong số các dẫn xuất Fab'-TNB sau đó được chuyển hoá lại thành Fab'-thiol bằng cách khử với mercaptoetylamin và được trộn với lượng mol cân bằng của dẫn xuất Fab'-TNB khác

để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra có thể được sử dụng làm các chất ổn định hoá chọn lọc enzym.

Các tiến bộ gần đây đã tạo thuận lợi cho việc thu hồi trực tiếp các mảnh Fab'-SH từ *E. coli,* mà có thể được cặp đôi về mặt hoá học để tạo thành các kháng thể đặc hiệu kép. Shalaby et al., J. Exp. Med. 175: 217-225 (1992) mô tả việc sản xuất họ phân tử kháng thể đặc hiệu kép được làm thích hợp với người $F(ab')_2$. Mỗi mảnh Fab' được tiết riêng rẽ từ *E. coli* và được cho vào cặp đôi trực tiếp hoá học *in vitro* để tạo thành kháng thể đặc hiệu kép. kháng thể đặc hiệu kép được tạo thành theo cách này có thể gắn kết với tế bào biểu hiện quá mức thụ thể ErbB2 và tế bào T thông thường của người, cũng như gây ra hoạt tính làm tan của các tế bào bạch huyết độc tố tế bào đối với các đích khối u vú của người.

Các kỹ thuật khác nhau để sản xuất và phân lập các mảnh kháng thể đặc hiệu kép trực tiếp từ môi trường nuôi cấy tế bào tái tổ hợp đã được mô tả. Ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép đã được sản xuất bằng cách sử dụng các khoá leuxin. Kostelny et al., J. Immunol. 148(5):1547-1553 (1992). Các peptit khoá leuxin từ Fos và Jun protein được liên kết với các phần Fab' của hai kháng thể khác nhau bằng cách dung hợp gen. Các homodime kháng thể được khử ở vùng khung để tạo thành các monome và sau đó oxy hoá lại để tạo thành các heterodime kháng thể. Phương pháp này cũng có thể được sử dụng để sản xuất các homodime kháng thể. Kỹ thuật "kháng thể kép" được mô tả bởi Hollinger et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90:6444-6448 (1993) đã tạo ra cơ chế khác nhau để sản xuất các mảnh kháng thể đặc hiệu kép. Các mảnh này bao gồm V_H được nối với V_L bởi cầu liên kết mà rất ngắn để cho phép cặp đôi giữa hai miền trên cùng chuỗi này. Do đó, các miền V_H và V_L của một mảnh được tạo đích với các miền V_L và V_H bổ sung của mảnh khác, nhờ đó tạo thành hai vị trí gắn kết kháng nguyên. Kế hoạch khác để sản xuất các mảnh kháng thể đặc hiệu kép bằng cách sử dụng các dime chuỗi đơn Fv (sFv) cũng đã được báo cáo. Xem Gruber et al., J. Immunol., 152:5368 (1994).

Các kháng thể với nhiều hơn hai hoá trị là được dự định. Ví dụ, các kháng thể hoá trị ba có thể được điều chế. Tutt et al., J. Immunol. 147:60 (1991).

6. Các kháng thể liên hợp khác loại

Các kháng thể liên hợp khác loại cũng nằm trong phạm vi của sáng chế. Các kháng thể liên hợp khác loại bao gồm hai kháng thể được kết hợp cùng hoá trị. Các

kháng thể này, ví dụ, bao gồm đến các tế bào hệ miễn dịch đích đến các tế bào không mong muốn [các bằng Mỹ số 4,676,980], và để điều trị lây nhiễm HIV [WO 91/00360; WO 92/200373; EP 03089]. Đã được dự định rằng các kháng thể có thể được điều chế *in vitro* bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong hoá tổng hợp protein, bao gồm các chất liên kết ngang. Ví dụ, các độc tố miễn dịch có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng phản ứng trao đổi disulfua hoặc bằng cách tạo thành liên kết thioete. Các ví dụ về các chất phản ứng thích hợp cho mục đích này bao gồm iminothiolat và metyl-4-mercaptobutyrimidat và đã được mô tả, ví dụ, trong bằng Mỹ số 4,676,980.

7. Các kháng thể đa hoá trị

Kháng thể đa hoá trị có thể được tiếp thu (và/hoặc trao đổi chất) nhanh hơn kháng thể hoá trị hai bằng các tế bào biểu hiện kháng nguyên mà kháng thể gắn kết. Các kháng thể theo sáng chế có thể là các kháng thể đa hoá trị (mà khác với lớp IgM) với ba hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên (ví dụ các kháng thể hoá trị bốn), mà có thể được tạo ra dễ dàng bằng cách biểu hiện tái tổ hợp axit nucleic mã hoá các chuỗi polypeptit của kháng thể. kháng thể đa hoá trị có thể bao gồm miền dime hoá và ba hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên. Miền dime hoá được ưu tiên bao gồm vùng Fc hoặc vùng khung. Trong trường hợp này, kháng thể sẽ bao gồm vùng Fc và ba hoặc nhiều vị trí gắn kết kháng nguyên tận cùng amino với vùng Fc. kháng thể đa hoá trị được ưu tiên ở đây bao gồm từ ba đến tám, nhưng tốt hơn là bốn, vị trí gắn kết kháng nguyên. kháng thể đa hoá trị bao gồm ít nhất là một chuỗi polypeptit (và tốt hơn là hai chuỗi polypeptit), trong đó (các) chuỗi polypeptit bao gồm hai hoặc nhiều miền biến đổi. Ví dụ, (các) chuỗi polypeptit có thể bao gồm VD1-$(X1)_n$-VD2-$(X2)_n$-Fc, trong đó VD1 là miền biến đổi thứ nhất, VD2 là miền biến đổi thứ hai, Fc là một chuỗi polypeptit của vùng Fc, X1 và X2 thể hiện axit amin hoặc polypeptit và n là 0 hoặc 1. Ví dụ, (các) chuỗi polypeptit có thể bao gồm: VH-CH1-cầu liên kết linh hoạt-VH-CH1-chuỗi vùng Fc; hoặc chuỗi vùng VH-CH1-VH-CH1-Fc. kháng thể đa hoá trị được ưu tiên ở đây còn bao gồm ít nhất là hai (và tốt hơn là bốn) polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ. kháng thể đa hoá trị ở đây có thể, ví dụ, bao gồm từ hai đến tám polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ. Các polypeptit miền biến đổi chuỗi nhẹ được dự định ở đây bao gồm miền biến đổi chuỗi nhẹ và, tuỳ ý, còn bao gồm miền CL.

8. Tạo chức năng phản ứng kích thích

Có thể mong muốn để cải biến kháng thể theo sáng chế với chức năng phản ứng kích thích, ví dụ, để tăng cường độc tố tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc kháng nguyên (ADCC) và/hoặc độc tố tế bào phụ thuộc phần bổ sung (CDC) của kháng thể. Điều này đạt được bằng cách đưa một hoặc nhiều thay thế axit amin vào vùng Fc của kháng thể. Theo cách khác hoặc ngoài ra, (các) gốc xystein có thể được đưa vào vùng Fc, nhờ đó cho phép tạo thành gắn kết disulfua nội phân tử trong vùng này. kháng thể homodime được sinh ra theo cách này có thể có khả năng hấp thu được cải thiện và/hoặc gia tăng giết chết tế bào qua trung gian phần bổ sung và độc tố tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC). Xem Caron et al., J. Exp Med. 176:1191-1195 (1992) và Shopes, B. J. Immunol. 148:2918-2922 (1992). Các kháng thể homodime với hoạt tính kháng khối u được tăng cường cũng có thể được điều chế bằng cách sử dụng các cầu liên kết ngang có hai chức khác loại như được mô tả trong Wolff et al., Cancer Research 53:2560-2565 (1993). Theo cách khác, kháng thể có thể được sinh ra mà có các vùng Fc kép và nhờ đó có thể tăng cường làm tan phần bổ sung và khả năng của ADCC. Xem Stevenson et al., Anti-Cancer Drug Design 3:219-230 (1989). Để gia tăng chu kỳ nửa phân rã huyết thanh của kháng thể, có thể kết hợp epitop gắn kết thụ thể an toàn vào kháng thể (đặc biệt là mảnh kháng thể) như được mô tả trong bằng Mỹ số 5,739,277, chẳng hạn. Như được sử dụng ở đây, thuật ngữ "epitop gắn kết thụ thể an toàn" đề cập đến epitop của vùng Fc của phân tử IgG (ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, hoặc IgG_4) có khả năng đáp ứng để gia tăng chu kỳ nửa phân rã huyết thanh in vivo của phân tử IgG.

9. Các thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế cũng đề xuất các thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể được liên hợp với chất độc tế bào như chất hoá trị liệu, chất ức chế sự phát triển, độc tố (ví dụ, độc tố có hoạt tính enzym của vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng) hoặc chất đồng vị phóng xạ (nghĩa là, liên hợp phóng xạ).

Theo một số phương án, liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể và chất hoá trị liệu hoặc độc tố khác. Các chất hoá trị liệu hữu ích trong việc sinh ra liên hợp miễn dịch này đã được mô tả trên đây. Các độc tố có hoạt tính enzym và các mảnh của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm chuỗi diphtheria A, các mảnh hoạt tính không gắn kết của độc tố diphtheri, chuỗi exotoxin A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modecxin A, alpha-sarxin, *Aleurites fordii* protein, dianthin protein, *Phytolaca americana* protein (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curxin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictocin, phenomyxin,

enomyxin và tricothexen. Nhiều nuclit phóng xạ là hiện có để sản xuất các kháng thể được liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm ^{212}Bi, ^{131}I, ^{131}In, ^{90}Y, và ^{186}Re. Các thể liên hợp của kháng thể và chất độc tế bào được tạo thành bằng cách sử dụng nhiều chất cặp đôi protein hai chức như N-sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithiol) propionat (SPDP), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCL), các este hoạt tính (như disucxinimidyl suberat), aldehyt (như glutareldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazon (như bis-(p-diazonbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như tolyen 2,6-diisoxyanat) và các hợp chất bis-flo hoạt tính (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta *et al.*, Science, 238: 1098 (1987). Axit cacbon-14-được đánh dấu 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic (MX-DTPA) là chất tạo chelat ví dụ đối với liên hợp của nuclotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO94/11026.

Các thể liên hợp của kháng thể và một hoặc nhiều độc tố phân tử nhỏ, như calicheamixin, auristatin peptit, như monometylauristatin (MMAE) (chất tương đương tổng hợp của dolastatin), maytansinoit, như DM1, trichothen và CC1065, và các dẫn xuất của các độc tố này mà có hoạt tính độc tố, cũng được bao gồm ở đây.

Các thể liên hợp miễn dịch mẫu – Thể liên hợp kháng thể-dược chất

Liên hợp miễn dịch (hoặc "thể liên hợp kháng thể-dược chất" ("ADC")) theo sáng chế có thể có công thức I, dưới đây, trong đó kháng thể được liên hợp (nghĩa là, được gắn cộng hoá trị) với một hoặc hoặc nhiều phần dược chất (D) thông qua cầu liên kết tuỳ ý (L). Các ADC có thể bao gồm các thể liên hợp dược chất thioMAb ("TDC").

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad I$$

Do đó, kháng thể có thể được liên hợp với dược chất trực tiếp hoặc qua cầu liên kết. Trong công thức I, p là số phần dược chất trung bình/kháng thể, mà có thể nằm trong khoảng, ví dụ, khoảng từ 1 đến 20 phần dược chất/kháng thể và theo một số phương án, từ 1 đến 8 phần dược chất/kháng thể. Sáng chế bao gồm chế phẩm bao gồm hỗn hợp gốc các hợp chất kháng thể-dược chất có công thức I trong đó lượng dược chất trung bình/kháng thể là khoảng từ 2 đến 5, hoặc khoảng từ 3 đến 4.

a. Các cầu liên kết ví dụ

Cầu liên kết có thể bao gồm một hoặc nhiều hợp phần cầu liên kết. Các hợp phần cầu liên kết ví dụ bao gồm 6-maleimidocaproyl ("MC"), maleimidopropanoyl

("MP"), valin-xitrulin ("val-cit" hoặc "vc"), alanin-phenylalanin ("ala-phe"), p-aminobenzyloxycarbonyl ("PAB"), và cầu liên kết là kết quả của việc liên hợp với các chất phản ứng cầu liên kết: N-Sucxinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoat ("SPP"), N-sucxinimidyl 4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1 carboxylat ("SMCC", cũng được đề cập ở đây là "MCC"), và N-Sucxinimidyl (4-iodo-axetyl) aminobenzoat ("SIAB"). Các hợp phần cầu liên kết khác nhau là đã biết trong lĩnh vực này, một số trong số chúng được mô tả dưới đây.

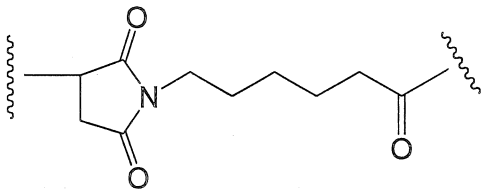
Cầu liên kết có thể là "cầu liên kết có thể phân tách," tạo thuận lợi giải phóng dược chất vào tế bào. Ví dụ, cầu liên kết không bền với axit (ví dụ, hydrazon), nhạy cầu liên kết proteaza (ví dụ, nhạy peptidaza), cầu liên kết không bền với ánh sáng, cầu liên kết dimetyl hoặc cầu liên kết chứa disulfua (Chari et al., Cancer Research 52:127-131 (1992); bằng Mỹ số 5,208,020) có thể được sử dụng.

Theo một số phương án, cầu liên kết được thể hiện trong công thức II sau đây:

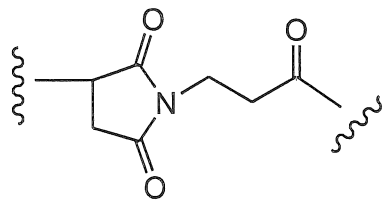
$$-A_a-W_w-Y_y- \qquad \text{II}$$

trong đó, A là đơn vị Stretcher và a là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 1; W là đơn vị axit amin, và w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12; Y là đơn vị khoảng trống và y là 0, 1, hoặc 2; và Ab, D, và p là như được xác định trên đây đối với công thức I. Các phương án ví dụ về các cầu liên kết này được mô tả trong US 2005-0238649 A1.

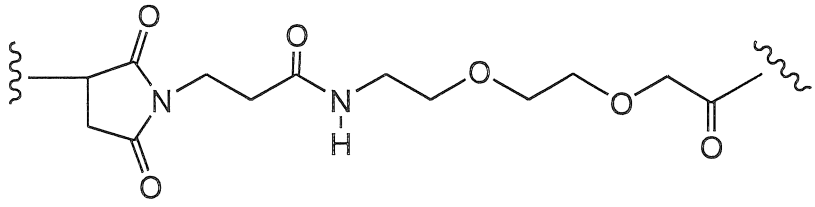
Theo một số phương án, hợp phần cầu liên kết có thể bao gồm "đơn vị Stretcher" mà liên kết kháng thể với hợp phần cầu liên kết khác hoặc với phần dược chất. Các đơn vị stretcher ví dụ được thể hiện dưới đây (trong đó đường hình sóng cho biết vị trí của gắn kết cộng hoá trị với kháng thể):



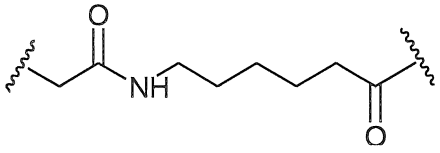
MC



MP



MPEG



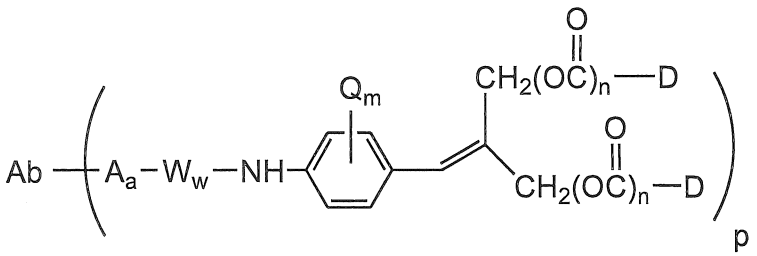
Theo một số phương án, hợp phần cầu liên kết có thể bao gồm đơn vị axit amin. Theo một trong số các phương án này, đơn vị axit amin cho phép phân tách cầu liên kết bởi proteaza, nhờ đó tạo điều kiện giải phóng dược chất khỏi liên hợp miễn dịch ngay khi tiếp xúc với proteaza nội bào, như enzym lysosom. Xem, *ví dụ*, Doronina et al. (2003) *Nat. Biotechnol.* 21:778-784. Các đơn vị axit amin ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, dipeptit, tripeptit, tetrapeptit và pentapeptit. Các dipeptit ví dụ bao gồm: valin-xitrulin (vc hoặc val-cit), alanin-phenylalanin (af hoặc ala-phe); phenylalanin-lysin (fk hoặc phe-lys); hoặc N-metyl-valin-xitrulin (Me-val-cit). Các tripeptit ví dụ bao gồm: glyxin-valin-xitrulin (gly-val-cit) và glyxin-glyxin-glyxin (gly-gly-gly). Đơn vị axit amin có thể bao gồm các gốc axit amin mà xuất hiện tự nhiên, cũng như các axit amin nhỏ và các chất tương tự axit amin không xuất hiện tự nhiên, như xitrulin. Các đơn vị axit amin có thể được xác định và được tối ưu hoá theo tính chọn lọc của chúng đối với sự phân tách enzym bởi enzym cụ thể, ví dụ, proteaza liên quan đến khối u, cathepsin B, C và D hoặc plasmin proteaza.

Theo một số phương án, hợp phần cầu liên kết có thể bao gồm đơn vị "khoảng trống" mà liên kết kháng thể với phần dược chất, trực tiếp hoặc bằng đơn vị stretcher và/hoặc đơn vị axit amin. Đơn vị khoảng trống có thể "tự chết" hoặc "không tự chết." Đơn vị khoảng trống "không tự chết" là đơn vị trong đó một phần hoặc tất cả đơn vị

khoảng trống vẫn gắn kết với phần dược chất ngay khi phân tách enzym (ví dụ, thuỷ phân protein) ADC. Các ví dụ về các đơn vị khoảng trống không tự chết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, đơn vị khoảng trống glyxin và đơn vị khoảng trống glyxin-glyxin. Các kết hợp khác về các khoảng trống peptit dễ bị phân tách enzym đặc hiệu trình tự cũng được bao gồm. Ví dụ, việc phân tách enzym của ADC chứa đơn vị khoảng trống glyxin-glyxin bởi proteaza liên quan đến tế bào khối u có thể dẫn đến giải phóng phần dược chất glyxin-glyxin khỏi phần còn lại của ADC. Theo một phương án, phần dược chất glyxin-glyxin được cho vào bước thuỷ phân riêng rẽ ở tế bào khối u, do đó phân tách đơn vị khoảng trống glyxin-glyxin khỏi phần dược chất.

Đơn vị khoảng trống "tự chết" cho phép giải phóng phần dược chất mà không cần bước thuỷ phân riêng rẽ. Theo một số phương án, đơn vị khoảng trống của cầu liên kết bao gồm đơn vị p-aminobenzyl. Theo một phương án, rượu p-aminobenzyl được gắn vào đơn vị axit amin qua liên kết amin và carbamat, metylcarbamat hoặc carbonat được tạo thành giữa rượu benzyl và chất độc tế bào. Xem, *ví dụ*, Hamann et al. (2005) *Expert Opin. Ther. Patents* (2005) 15:1087-1103. Theo một phương án, đơn vị khoảng trống là p-aminobenzyloxycarbonyl (PAB). Theo một số phương án, phần phenylen của đơn vị p-amino benzyl được thế với Qm, trong đó Q là -C_1-C_8 alkyl, -O-(C_1-C_8 alkyl), -halogen,- nitro hoặc -xyano; và m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-4. Các ví dụ về các đơn vị khoảng trống tự chết còn bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các hợp chất thơm mà tương tự về mặt điện tích với rượu p-aminobenzyl (xem, *ví dụ*, US 2005/0256030 A1), như các dẫn xuất 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 9:2237) và ortho- hoặc para-aminobenzylaxetal. Các khoảng trống có thể được sử dụng mà trải qua việc kết tủa ngay khi thuỷ phân liên kết amit, như amit của axit 4-aminobutyric được thế và không được thế (Rodrigues et al., *Chemistry Biology*, 1995, 2, 223); các hệ vòng hai vòng [2.2.1] và hai vòng [2.2.2] được thế thích hợp (Storm, et al., *J. Amer. Chem. Soc.*, 1972, 94, 5815); và các amit của axit 2-aminophenylpropionic (Amsberry, et al., *J. Org. Chem.*, 1990, 55, 5867). Việc loại bỏ các dược chất chứa amin mà được thế ở vị trí a của glyxin (Kingsbury, et al., *J. Med. Chem.*, 1984, 27, 1447) cũng là các ví dụ về các khoảng trống tự chết ở ADC.

Theo một phương án, đơn vị khoảng trống là bis(hydroxymetyl)styren mạch nhánh (BHMS) như được mô tả dưới đây, mà có thể được sử dụng để kết hợp và giải phóng nhiều dược chất.



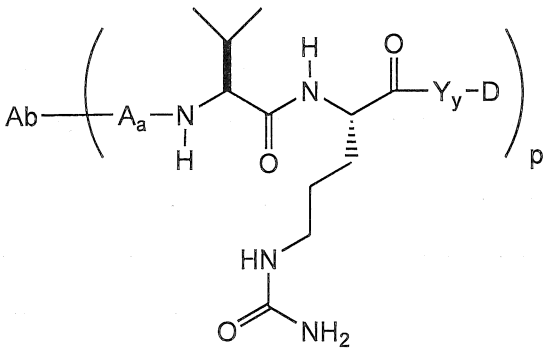
Phân tách enzym

2 2 dược chất

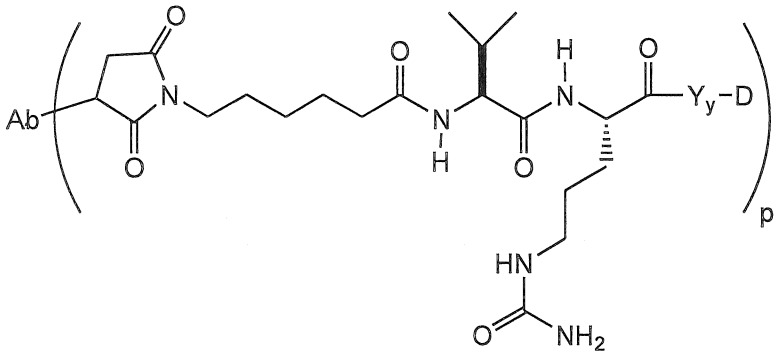
trong đó Q là -C_1-C_8 alkyl, -O-(C_1-C_8 alkyl), -halogen, -nitro hoặc -xyano; m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-4; n là 0 hoặc 1; và p nằm trong khoảng từ 1 đến 20.

Theo phương án khác, cầu liên kết L có thể là cầu liên kết hình cây để gắn kết cộng hoá trị nhiều hơn một phần dược chất thông qua phần cầu liên kết phân nhánh, đa chức với kháng thể (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Các cầu liên kết hình cây có thể gia tăng tỷ lệ mol của dược chất với kháng thể, nghĩa là lượng mà liên quan đến hiệu lực của ADC. Do đó, kháng thể được xử lý bởi xystein chỉ mang một nhóm xystein thiol phản ứng, nhiều phần dược chất có thể được gắn vào thông qua cầu liên kết hình cây.

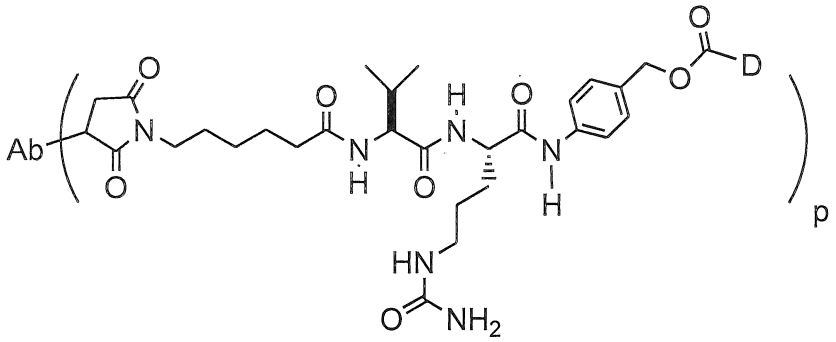
Các hợp phần cầu liên kết hình cây ví dụ và các kết hợp của chúng được thể hiện dưới đây trong ADC có công thức II:



Val-Cit hoặc VC



MC-val-cit



MC-val-cit-PAB

Các hợp phần cầu liên kết, bao gồm các đơn vị stretcher, khoảng trống và axit amin có thể được tổng hợp bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như các phương pháp được mô tả trong US 2005-0238649 A1.

b. Các phần dược chất ví dụ

(1) Maytansin và maytansinoit

Theo một số phương án, liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử maytansinoit. Maytansinoit là các chất ức chế mitototic mà hoạt động bằng cách ức chế tubulin polyme hoá. Maytansin được phân lập lần đầu tiên từ ngoại ô phía đông châu Phi Maytenus serrata (bằng Mỹ số 3896111). Sau đó, nó được phát hiện rằng một số vi sinh vật cũng sản xuất maytansinoit, như maytansinol và C-3 maytansinol este (bằng Mỹ số 4,151,042). Maytansinol và các dẫn xuất tổng hợp và các chất tương tự của chúng được mô tả, ví dụ, trong các bằng Mỹ số 4,137,230; 4,248,870; 4,256,746; 4,260,608; 4,265,814; 4,294,757; 4,307,016; 4,308,268; 4,308,269; 4,309,428; 4,313,946; 4,315,929; 4,317,821; 4,322,348; 4,331,598; 4,361,650; 4,364,866; 4,424,219; 4,450,254; 4,362,663; và 4,371,533.

Các phần dược chất maytansinoit là các phần dược chất hấp dẫn trong các thể liên hợp kháng thể-dược chất bởi vì chúng là: (i) có thể sử dụng tương đối để điều chế cải biến bằng cách lên men hoặc hóa học, tạo dẫn xuất các sản phẩm lên men, (ii) thích hợp để tạo dẫn xuất với các nhóm chức thích hợp để liên hợp thông qua các cầu liên kết disulfua và không disulfua đối với các kháng thể, (iii) có thể ổn định trong huyết tương và (iv) có hiệu quả chống lại nhiều dòng tế bào khối u.

Các hợp chất maytansin thích hợp để sử dụng như các phần dược chất maytansinoit là đã biết trong lĩnh vực này và có thể được phân lập từ các nguồn tự nhiên theo các phương pháp đã biết, được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật di truyền và lên men (US 6790952; US 2005/0170475; Yu et al (2002) PNAS 99:7968-7973). Maytansinol và các chất tương tự maytansinol cũng có thể được tạo ra về mặt tổng hợp theo các phương pháp đã biết.

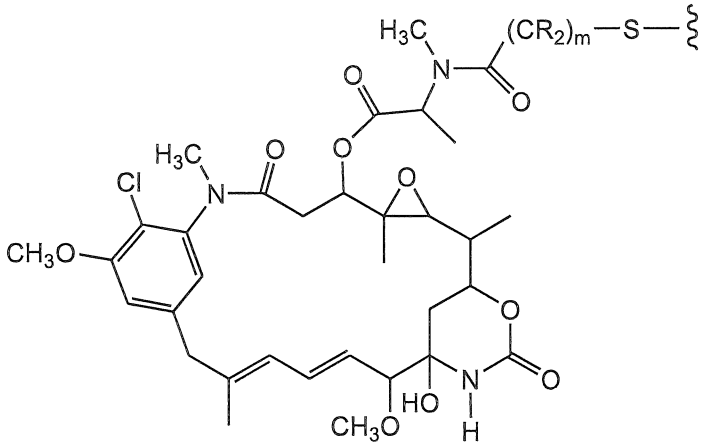
Các phần dược chất maytansinoit ví dụ bao gồm các phần có vòng thơm được cải biến, như: C-19-declo (bằng Mỹ số US 4256746) (được điều chế bằng cách khử nhôm hydrua của ansamytoxin P2); C-20-hydroxy (hoặc C-20-demetyl) +/-C-19-declo (các bằng Mỹ số 4361650 và 4307016) (được điều chế bằng cách demetyl hóa bằng cách sử dụng Streptomyces hoặc Actinomyces hoặc declorin hóa bằng cách sử dụng LAH); và C-20-demetoxy, C-20-axyloxy (-OCOR), +/-declo (Bằng Mỹ số 4,294,757) (được điều chế bằng cách axyl hóa bằng cách sử dụng axyl clorua), và có các cải biến ở các vị trí khác.

Các phần dược chất maytansinoit ví dụ cũng bao gồm các phần có các cải biến như: C-9-SH (bằng Mỹ số 4424219) (được điều chế bằng phản ứng của maytansinol với H_2S hoặc P_2S_5); C-14-alkoxymetyl(demetoxy/CH_2OR)(US 4331598); C-14-hydroxymetyl hoặc axyloxymetyl (CH_2OH hoặc CH_2OAc) (bằng Mỹ số 4450254) (được điều chế từ Nocardia); C-15-hydroxy/axyloxy (bằng Mỹ số 4,364,866) (được điều chế bằng cách chuyển hóa maytansinol bởi Streptomyces); C-15-metoxy (các bằng Mỹ số 4,313,946 và 4,315,929) (được phân lập từ Trewia nudlflora); C-18-N-demetyl (các bằng Mỹ số 4,362,663 và 4,322,348) (được điều chế bằng cách metyl hóa khử maytansinol bởi Streptomyces); và 4,5-deoxy (bằng Mỹ số 4371533) (được điều chế bởi titan triclorua/LAH khử maytansinol).

Nhiều vị trí trên các hợp chất maytansin là đã biết là hữu ích như vị trí liên kết, phụ thuộc vào kiểu liên kết. Ví dụ, để tạo thành liên kết este, vị trí C-3 có nhóm hydroxyl, vị trí C-14 được cải biến với hydroxymetyl, vị trí C-15 được cải biến với

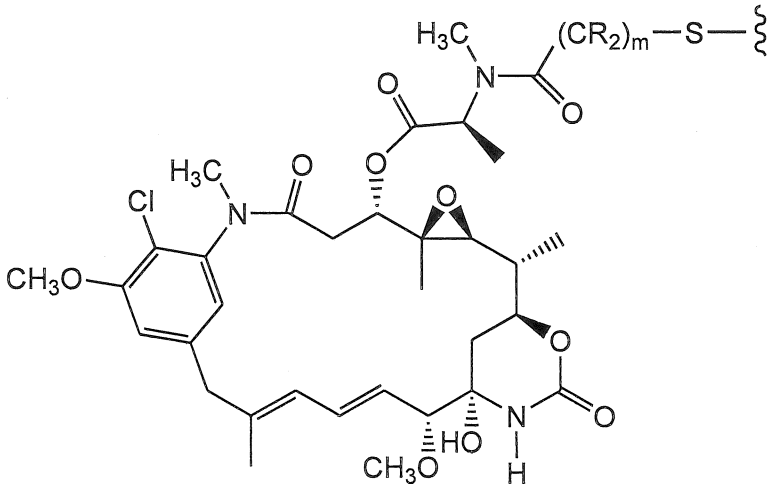
nhóm hydroxyl và vị trí C-20 có nhóm hydroxyl là thích hợp tất cả (US 5208020; US RE39151; US 6913748; US 7368565; US 2006/0167245; US 2007/0037972).

Các phần maytansinoit dược chất bao gồm các phần có cấu trúc:

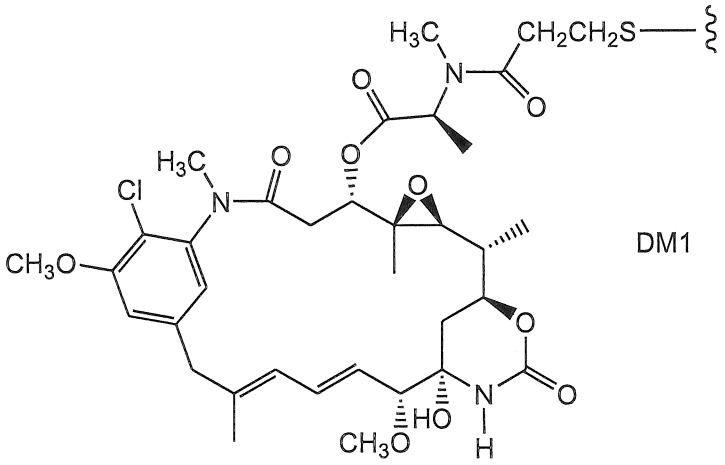


trong đó đường gợn sóng cho biết gắn kết cộng hóa trị nguyên tử lưu huỳnh của phần maytansinoit dược chất với cầu liên kết của ADC. R có thể độc lập là H hoặc a C_1-C_6 alkyl. Chuỗi alkylen gắn nhóm amit với nguyên tử lưu huỳnh có thể là metanyl, etanyl, hoặc propyl, nghĩa là, m là 1, 2, hoặc 3 (US 633410 ; US 5208020; US 7276497; Chari et al (1992) *Cancer Res.* 52:127-131; Liu et al (1996) *Proc. Natl. Acad. Sci USA* 93:8618-8623).

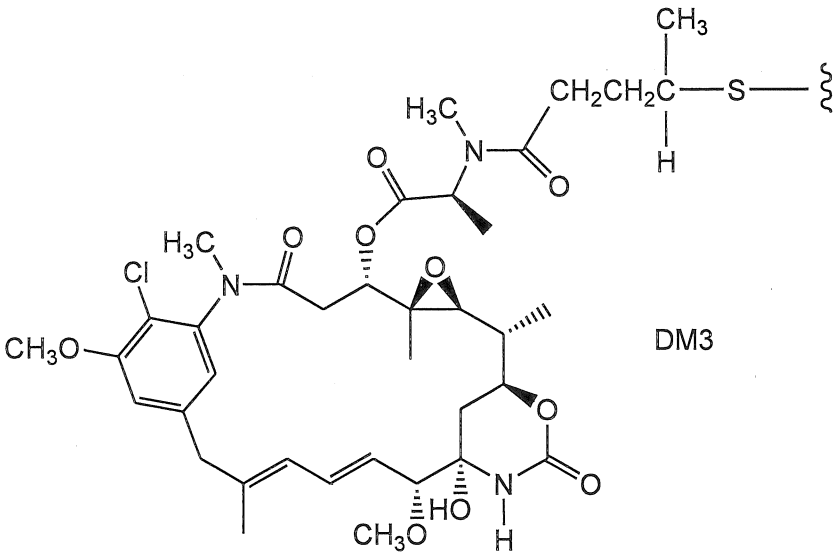
Tất cả chất đồng phân lập thể của phần dược chất maytansinoit được bao gồm đối với hợp chất theo sáng chế, nghĩa là kết hợp bất kỳ các cấu hình *R* và *S* ở các cacbon không đối xứng của D. Theo một phương án, phần dược chất maytansinoit sẽ có hoá học lập thể sau đây:



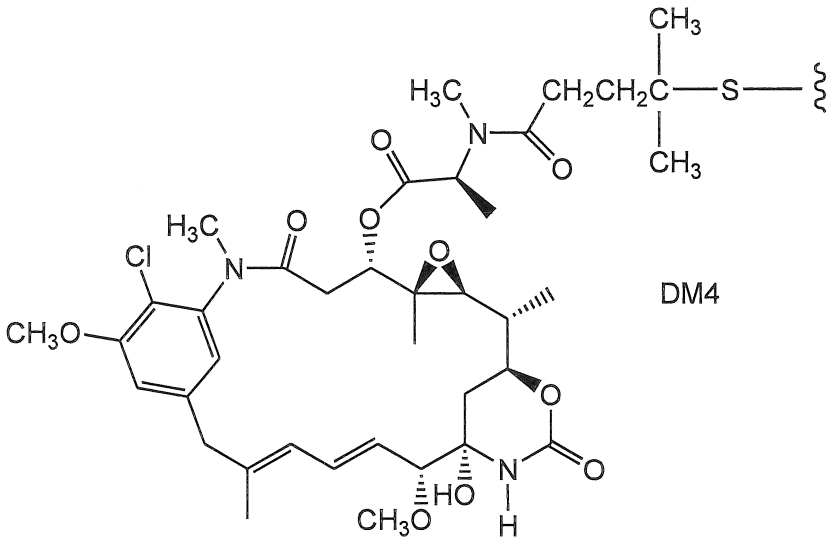
Các phương án ví dụ về các phần maytansinoit dược chất bao gồm: DM1; DM3; và DM4, có cấu trúc:



DM1

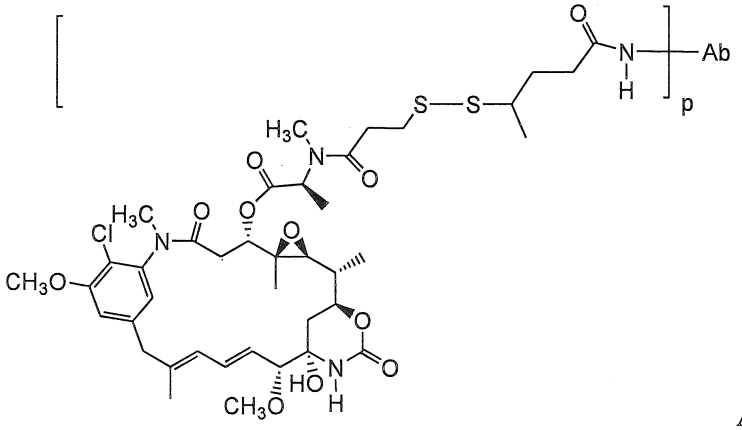


DM3

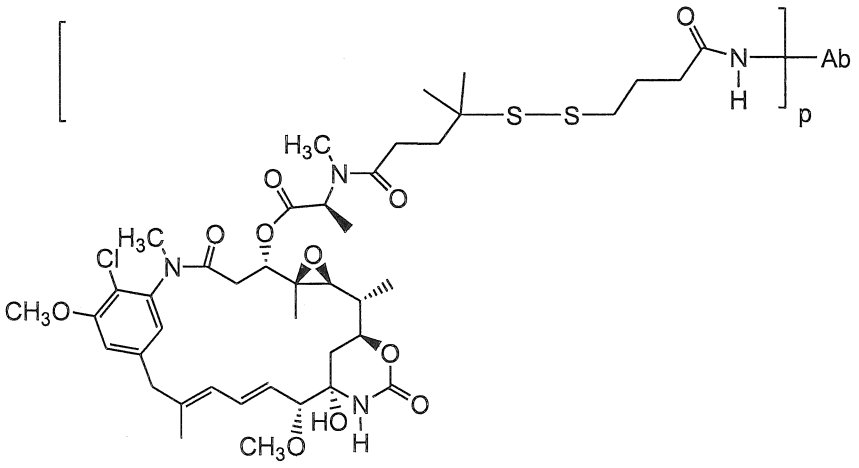


trong đó, đường hình sóng cho biết gắn kết cộng hoá trị của nguyên tử lưu huỳnh của dược chất với cầu liên kết (L) của thể liên hợp kháng thể-dược chất. (WO 2005/037992; US 2005/0276812 A1).

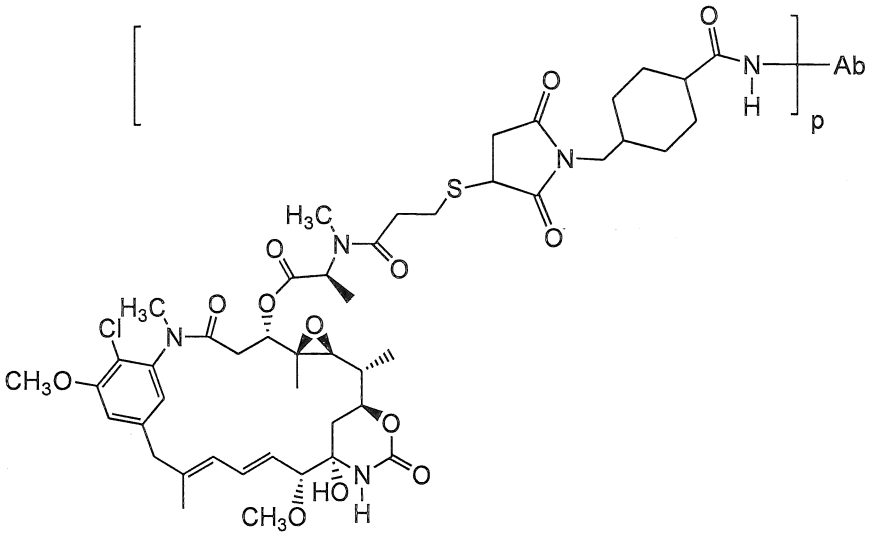
Các thể liên hợp kháng thể-dược chất maytansinoit ví dụ khác có cấu trúc và chữ viết tắt sau đây, (trong đó Ab là kháng thể và p là từ 1 đến 8):



Ab -SPP-DM1

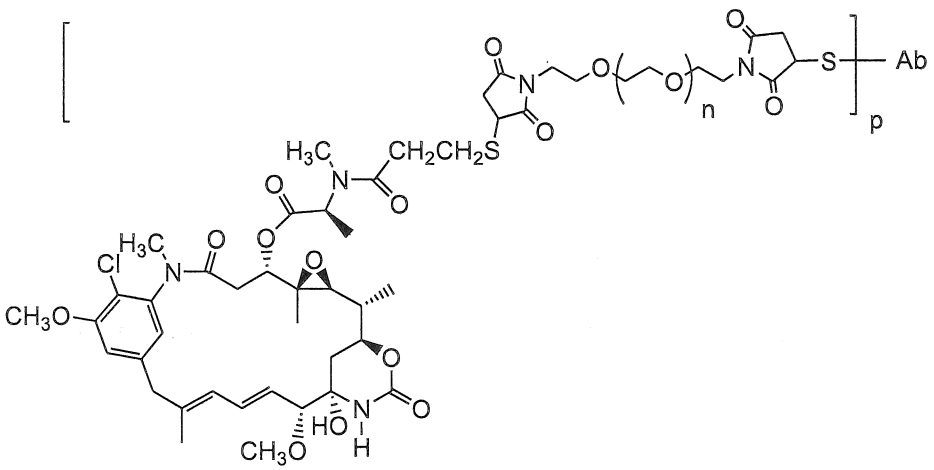


Ab-SPDB-DM4



Ab-SMCC-DM1

Các thể liên hợp kháng thể-dược chất ví dụ trong đó DM1 được liên kết qua cầu liên kết BMPEO với nhóm thiol của kháng thể có cấu trúc và chữ viết tắt sau đây:



trong đó Ab là kháng thể; n là 0, 1, hoặc 2; và p là 1, 2, 3, hoặc 4.

Các thể liên hợp miễn dịch chứa maytansinoit, phương pháp sản xuất chúng và sử dụng chúng để điều trị được mô tả, ví dụ, trong Erickson, et al (2006) Cancer Res. 66(8):4426-4433; các bằng Mỹ số 5,208,020, 5,416,064, US 2005/0276812 A1, và bằng châu Âu số EP 0 425 235 B1.

Các thể liên hợp kháng thể kháng STEAP-1-maytansinoit được điều chế bằng cách liên kết hóa học kháng thể với phân tử maytansinoit mà không làm giảm đáng kể hoạt tính sinh học của kháng thể hoặc phân tử maytansinoit. Xem, ví dụ, bằng Mỹ số 5,208,020. Maytansinoit có thể được tổng hợp bằng các kỹ thuật đã biết hoặc được phân lạp từ nguồn tự nhiên. Các maytansinoit thích hợp được mô là, ví dụ, trong bằng Mỹ số 5,208,020 và các bằng sáng chế khác và các công bố phi sáng chế được đề cập trên đây, như maytansinol và các chất tương tự maytansinol được cải biến ở vòng thơm hoặc ở các vị trí khác của phân tử maytansinol, như maytansinol este khác nhau.

Có nhiều nhóm liên kết đã biết trong lĩnh vực này để sản xuất các thể liên hợp kháng thể-maytansinoit, bao gồm, ví dụ, được bộc lộ trong bằng Mỹ số 5,208,020, hoặc bằng châu Âu số 0 425 235 Bl, Chari et al., Cancer Research 52: 127-131 (1992), và US 2005/016993 Al. Các thể liên hợp kháng thể-maytansinoit bao gồm hợp phần cầu liên kết SMCC có thể được điều chế như được bộc lộ trong US 2005/0276812 A1, "Antibody Drug Conjugates and Methods". Các cầu liên kết bao gồm các nhóm disulfua, các nhóm thioete, các nhóm dễ phân hủy axit, các nhóm dễ phân hủy ánh sáng, các nhóm dễ phân hủy peptidaza hoặc các nhóm dễ phân hủy esteraza, như được bộc lộ trong các bằng sáng chế được xác định trên đây. Các cầu liên kết bổ sung là được mô tả và được xác định ở đây.

Các thể liên hợp kháng thể và maytansinoit có thể được điều chế bằng cách sử dụng các chất cặp đôi protein hai chức như N-Sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), Sucxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-l-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt hóa (như disucxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất bis-flo hoạt hóa (như l,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Theo một số phương án, các chất cặp đôi là N-Sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP) (Carlsson et al, Biochem. J. 173:723-737 (1978)) hoặc N-Sucxinimidyl-4-(2-pyridylthio)pentanoat (SPP) để tạo ra liên kết disulfua.

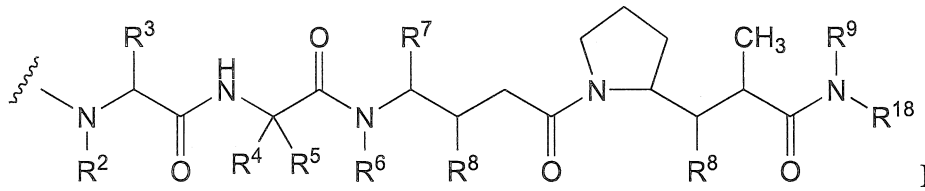
Cầu liên kết có thể được gắn vào phân tử maytansinoit ở các vị trí khác nhau, phụ thuộc vào kiểu liên kết. Ví dụ, liên kết este có thể được tạo thành bằng phản ứng với nhóm hydroxyl bằng cách sử dụng các kỹ thuật cặp đôi thông thường. Phản ứng này có thể xảy ra ở vị trí C-3 có nhóm hydroxyl, vị trí C-14 được cải biến với hydroxymetyl, vị trí C-15 được cải biến với nhóm hydroxyl và vị trí C-20 có nhóm hydroxyl. Theo phương án được ưu tiên, việc liên kết được tạo thành ở vị trí C-3 của maytansinol hoặc maytansinol tương đương.

(2) Auristatin và dolastatin

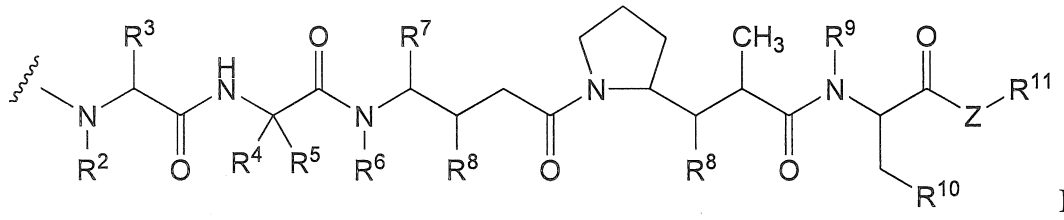
Theo một số phương án, liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể được liên hợp với dolastatin hoặc dolostatin peptit tương đương hoặc dẫn xuất, ví dụ auristatin (các bằng Mỹ số 5,635,483; 5,780,588). Các dolastatin và auristatin đã thể hiện để cản trở động lực học vi ống, thủy phân GTP và phân chia nhân và tế bào (Woyke et al (2001) Antimicrob. Agents and Chemother. 45(12):3580-3584) và có hoạt tính kháng bệnh ung thư (US 5,663,149) và hoạt tính kháng nấm (Pettit et al (1998) Antimicrob. Agents Chemother. 42:2961-2965). Phần dược chất dolastatin hoặc auristatin có thể được gắn vào kháng thể thông qua tận cùng N (amino) hoặc tận cùng C (carboxyl) của phần dược chất peptit (WO 02/088172).

Các phương án auristatin ví dụ bao gồm các phần dược chất monometylauristatin được liên kết tận cùng N DE và DF (US 2005/0238649), được bộc lộ trong "Senter et al, Proceedings of the American Association for Cancer Research, Volume 45, Abstract Number 623, ngày 28/3/2004.

Phần peptit dược chất có thể được chọn từ các công thức D_E và D_F dưới đây:



D_E



D_F

trong đó đường gợn sống D_E và D_F cho biết vị trí gắn kết cộng hoá trị với kháng thể hoặc hợp phần kháng thể cầu liên kết và độc lập ở mỗi vị trí:

R^2 được chọn từ H và C_1-C_8 alkyl;

R^3 được chọn từ H, C_1-C_8 alkyl, C_3-C_8 vòng cacbon, aryl, C_1-C_8 alkyl-aryl, C_1-C_8 alkyl-(C_3-C_8 vòng cacbon), C_3-C_8 dị vòng và C_1-C_8 alkyl-(C_3-C_8 dị vòng);

R^4 được chọn từ H, C_1-C_8 alkyl, C_3-C_8 vòng cacbon, aryl, C_1-C_8 alkyl-aryl, C_1-C_8 alkyl-(C_3-C_8 vòng cacbon), C_3-C_8 dị vòng và C_1-C_8 alkyl-(C_3-C_8 dị vòng);

R^5 được chọn từ H và metyl;

hoặc R^4 và R^5 cùng tạo thành vòng cacbon và có công thức $-(CR^aR^b)_n-$ trong đó R^a và R^b độc lập được chọn từ H, C_1-C_8 alkyl và C_3-C_8 vòng cacbon và n được chọn từ 2, 3, 4, 5 và 6;

R^6 được chọn từ H và C_1-C_8 alkyl;

R^7 được chọn từ H, C_1-C_8 alkyl, C_3-C_8 vòng cacbon, aryl, C_1-C_8 alkyl-aryl, C_1-C_8 alkyl-(C_3-C_8 vòng cacbon), C_3-C_8 dị vòng và C_1-C_8 alkyl-(C_3-C_8 dị vòng);

mỗi R^8 độc lập được chọn từ H, OH, C_1-C_8 alkyl, C_3-C_8 vòng cacbon và O-(C_1-C_8 alkyl);

R^9 được chọn từ H và C_1-C_8 alkyl;

R^{10} được chọn từ aryl hoặc C_3-C_8 dị vòng;

Z là O, S, NH, hoặc NR^{12}, trong đó R^{12} là C_1-C_8 alkyl;

R^{11} được chọn từ H, C_1-C_{20} alkyl, aryl, C_3-C_8 dị vòng, -$(R^{13}O)_m$-R^{14}, hoặc -$(R^{13}O)_m$-$CH(R^{15})_2$;

m là số nguyên nằm trong khoảng từ 1-1000;

R^{13} là C_2-C_8 alkyl;

R^{14} là H hoặc C_1-C_8 alkyl;

mỗi R^{15} độc lập là H, COOH, -$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$, -$(CH_2)_n$-SO_3H, hoặc -$(CH_2)_n$-SO_3-C_1-C_8 alkyl;

mỗi R^{16} độc lập là H, C_1-C_8 alkyl, hoặc -$(CH_2)_n$-COOH;

R^{18} được chọn từ -$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-aryl, -$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-(C_3-C_8 dị vòng), và -$C(R^8)_2$-$C(R^8)_2$-(C_3-C_8 vòng cacbon); và

n là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 6.

Theo một phương án, R^3, R^4 và R^7 độc lập là isopropyl hoặc sec-butyl và R^5 là –H hoặc metyl. Theo phương án ví dụ, R^3 và R^4 là isopropyl, R^5 là -H, và R^7 là sec-butyl.

Theo phương án khác khác nữa, R^2 và R^6 là metyl, và R^9 là -H.

Vẫn theo phương án khác, mỗi R^8 là -OCH_3.

Theo phương án ví dụ, mỗi R^3 và R^4 là isopropyl, mỗi R^2 và R^6 là metyl, R^5 là -H, R^7 là sec-butyl, mỗi lần xuất hiện R^8 là -OCH_3, và R^9 là -H.

Theo một phương án, Z là -O- hoặc -NH-.

Theo một phương án, R^{10} là aryl.

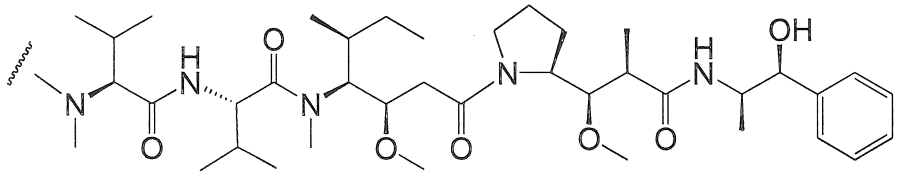
Theo phương án ví dụ, R^{10} là -phenyl.

Theo phương án ví dụ, khi Z là -O-, R^{11} là –H, metyl hoặc t-butyl.

Theo một phương án, khi Z là -NH, R^{11} là -$CH(R^{15})_2$, trong đó R^{15} là -$(CH_2)_n$-$N(R^{16})_2$, và R^{16} là -C_1-C_8 alkyl hoặc -$(CH_2)_n$-COOH.

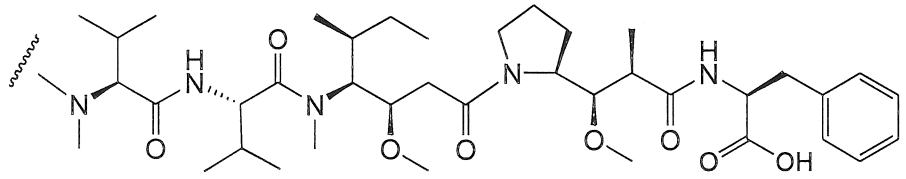
Theo phương án khác, khi Z là -NH, R^{11} là -$CH(R^{15})_2$, trong đó R^{15} là -$(CH_2)_n$-SO_3H.

Phương án auristatin ví dụ có công thức D_E là MMAE, trong đó đường gợn sóng cho biết gắn kết cộng hoá trị với cầu liên kết (L) của thể liên hợp kháng thể-dược chất:



MMAE

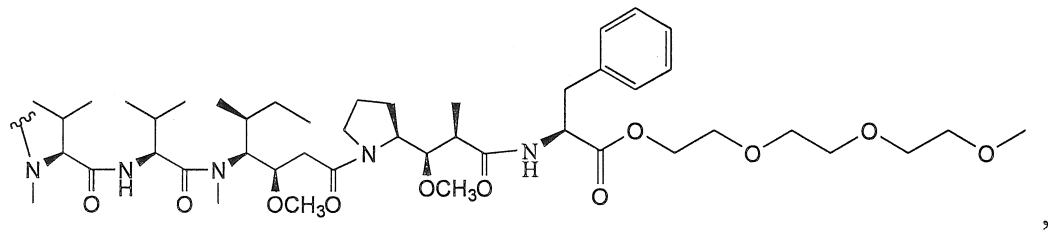
Phương án ví dụ auristatin có công thức D_F là MMAF, trong đó đường gợn sóng cho biết gắn kết cộng hoá trị với cầu liên kết (L) của thể liên hợp kháng thể-dược chất (xem US 2005/0238649 và Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124):



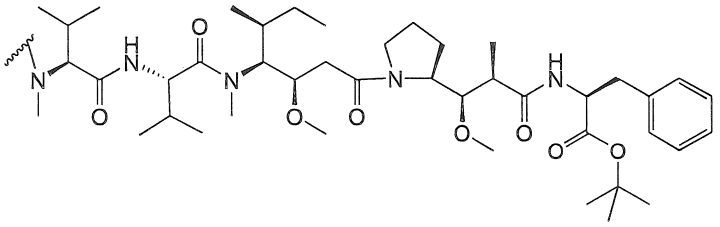
MMAF

Phương án ví dụ khác bao gồm các hợp chất monometylvalin có các cải biến phenylalanin carboxy ở tận cùng C của phần dược chất pentapeptit auristatin (WO 2007/008848) và các hợp chất monometylvalin có các cải biến phenylalanin chuỗi phụ ở tận cùng C của phần dược chất pentapeptit auristatin (WO 2007/008603).

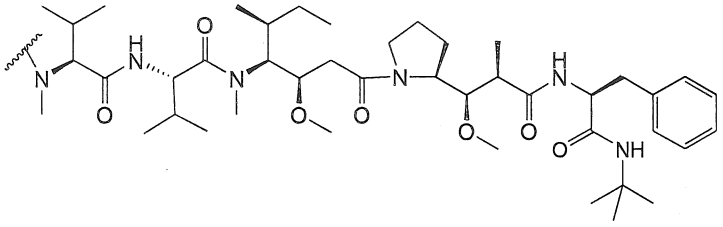
Các phần dược chất khác bao gồm các dẫn xuất MMAF sau đây, trong đó đường gợn sóng cho biết gắn kết cộng hoá trị với cầu liên kết (L) của thể liên hợp kháng thể-dược chất:



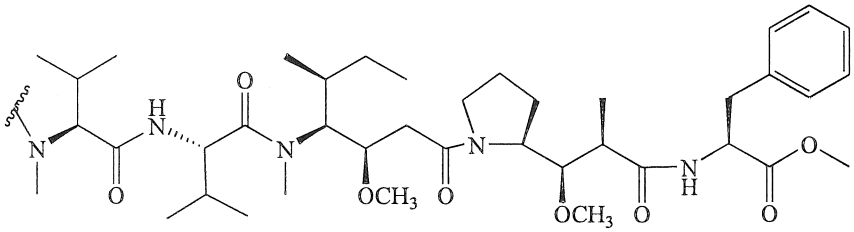
,



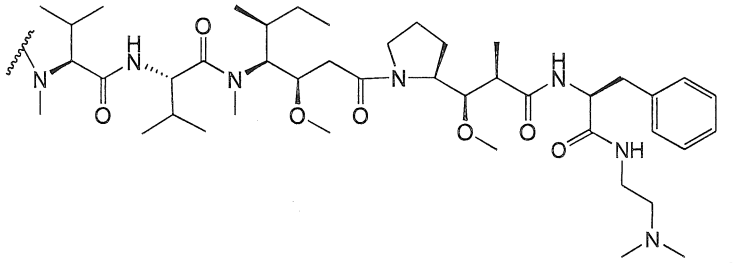
,



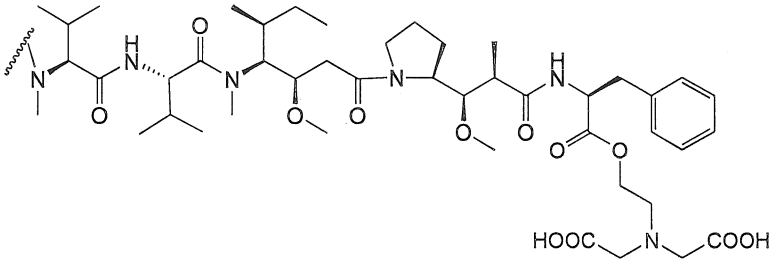
,



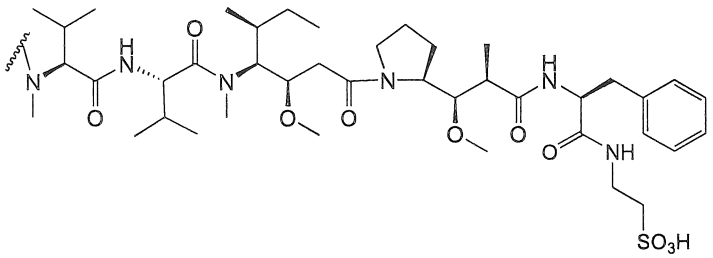
,



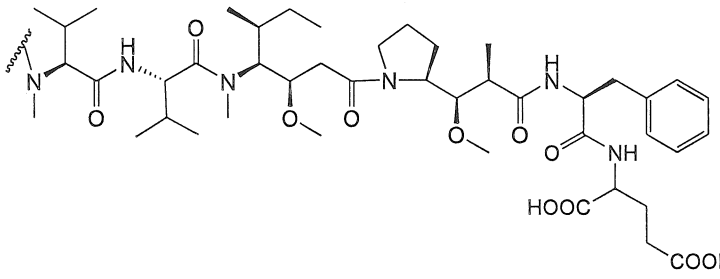
,



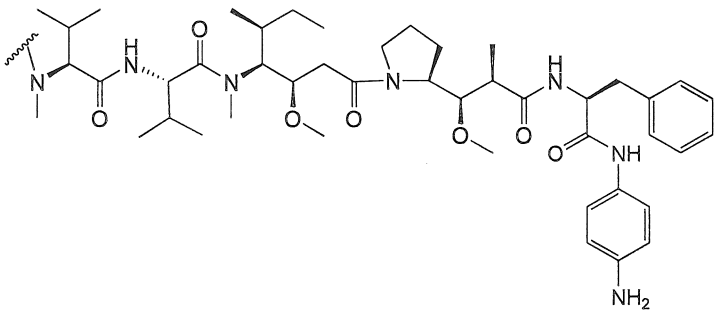
,



,



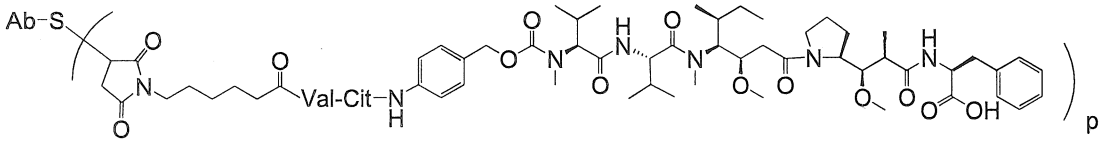
, và



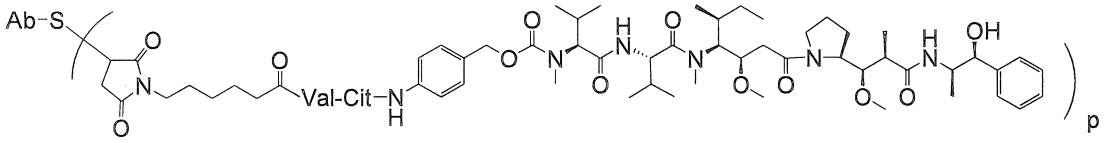
Theo một khía cạnh, các nhóm ưa nước bao gồm nhưng không chỉ giới hạn đến, trietylen glycol este (TEG), như được thể hiện trên đây, có thể được gắn vào phần dược chất ở R^{11}. Không được gắn kết theo lý thuyết bất kỳ, các nhóm ưa nước trợ giúp tiếp thu và không tích tụ phần dược chất.

Các phương án ví dụ về các ADC có công thức I bào gồm auristatin/dolastatin hoặc dẫn xuất của chúng được mô tả trong US 2005-0238649 và Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Các phương án ví dụ về ADC có công thức I bao gồm MMAE hoặc MMAF và các hợp phần cầu liên kết khác nhau có cấu trúc và chữ viết tắt sau đây (trong đó "Ab" là kháng thể; p là từ 1 đến 8, "Val-Cit" hoặc "vc" là valin-xitrulin dipeptit; và "S" là nguyên tử lưu huỳnh. Sẽ được lưu ý rằng một số mô tả cấu trúc của lưu huỳnh được liên kết ADC ở đây, kháng thể được thể hiện là "Ab-S" cho biết dấu hiệu liên kết lưu huỳnh và không cho biết rằng nguyên tử lưu huỳnh cụ thể mang nhiều phần cầu liên kết-dược chất. Dấu ngoặc đơn bên trái của cấu trúc sau

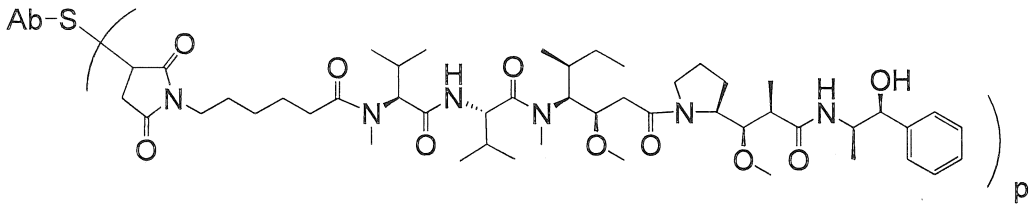
đây cũng có thể được đặt vào bên trái của nguyên tử lưu huỳnh, giữa Ab và S, mà sẽ mô tả tương đương ADC theo sáng chế được mô tả hoàn toàn ở đây.



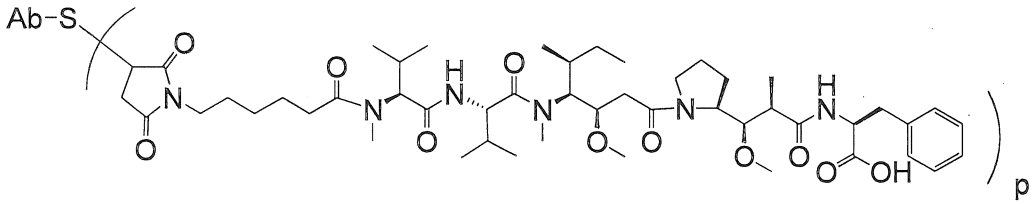
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF

Các phương án ví dụ về các ADC có công thức I bao gồm MMAF và các hợp phần cầu liên kết khác nhau còn bao gồm Ab-MC-PAB-MMAF và Ab-PAB-MMAF. Một điều thú vị là, các thể liên hợp miễn dịch bao gồm MMAF được gắn với kháng thể bởi cầu liên kết mà không thể phân tách bằng cách thuỷ phân protein đã được thể hiện là có hoạt tính có thể so với các thể liên hợp miễn dịch bao gồm MMAF được gắn với kháng thể bởi cầu liên kết có thể phân tách bằng cách thuỷ phên protein. Xem, Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Trong trường hợp này, việc giải phóng dược chất được cho là có hiệu qủa bằng cách thuỷ phân kháng thể ở tế bào.

Thông thường, các phần dược chất trên peptit có thể được điều chế bằng cách tạo liên kết peptit giữa hai hoặc nhiều axit amin và/hoặc các mảnh peptit. Các liên kết peptit này có thể được tạo ra, ví dụ theo phương pháp tổng hợp pha lỏng (xem E. Schroder and K. Lübke, "The Peptides", volume 1, pp 76-136, 1965, Academic Press)

mà là đã biết trong lĩnh vực hóa học peptit. Các phần dược chất auristatin/dolastatin có thể được điều chế theo các phương pháp của: US 2005-0238649 A1; bằng Mỹ số 5635483; bằng Mỹ số 5780588; Pettit et al (1989) *J. Am. Chem. Soc.* 111:5463-5465; Pettit et al (1998) *Anti-Cancer Drug Design* 13:243-277; Pettit, G.R., et al. *Synthesis*, 1996, 719-725; Pettit et al (1996) *J. Chem. Soc. Perkin Trans.* 15:859-863; và Doronina (2003) *Nat. Biotechnol.* 21(7):778-784.

Cụ thể là, các phần dược chất auristatin/dolastatin có công thức D_F, như MMAF và các dẫn xuất của chúng, có thể được tạo thành bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong US 2005-0238649 A1 và Doronina et al. (2006) *Bioconjugate Chem.* 17:114-124. Các phần dược chất auristatin/dolastatin có công thức D_E, như MMAE và các dẫn xuất của chúng, có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp được mô tả trong Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784. Các phần dược chất-cầu liên kết MC-MMAF, MC-MMAE, MC-vc-PAB-MMAF, và MC-vc-PAB-MMAE có thể được tổng hợp thông thường bằng các phương pháp thông thường, ví dụ, như được mô tả trong Doronina et al. (2003) *Nat. Biotech.* 21:778-784, và đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 2005/0238649 A1, và sau đó được liên hợp với kháng thể quan tâm.

(3) Calicheamixin

Trong phương án khác, liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử calicheamixin. Họ calicheamixin của các chất kháng sinh có khả năng tạo ra ADN sợi kép phá vỡ ở các nồng độ dưới picomol. Để điều chế các thể liên hợp của họ calicheamixin, xem các bằng Mỹ số 5,712,374, 5,714,586, 5,739,116, 5,767,285, 5,770,701, 5,770,710, 5,773,001, 5,877,296 (tất cả của American Cyanamid Company). Các chất tương đương cấu trúc của calicheamixin mà có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, γ_1^I, α_2^I, α_3^I, N-acetyl-γ_1^I, PSAG và θ^I_1 , PSAG và θ^1) (Hinman et al., Cancer Research 53:3336-3342 (1993), Lode et al., Cancer Research 58:2925-2928 (1998) và các bằng Mỹ được nêu trên đây của American Cyanamid). Dược chất kháng khối u khác mà kháng thể có thể được liên hợp là QFA mà kháng folat. Cả calicheamixin và QFA có các vị trí hoạt động nội phân tử và không liên kết ngang dễ dàng với màng huyết tương. Do đó, tế bào hấp thu các chất này thông qua kháng thể qua trung gian tiếp thu tăng cường ở mức độ lớn hiệu quả độc tố tế bào của chúng.

c. Các chất độc tế bào khác

Các chất kháng khối u khác mà có thể được liên hợp với kháng thể bao gồm BCNU, streptozoixin, vincristin và 5-flouraxil, họ các chất này đã biết là phức LL-E33288 chọn lọc được mô tả trong các bằng Mỹ số 5,053,394, 5,770,710, cũng như esperamixin (bằng Mỹ số 5,877,296).

Các chất độc có hoạt tính enzym và các mảnh của chúng mà có thể được sử dụng bao gồm chuỗi bệnh bạch cầu A, các mảnh hoạt tính không gắn kết của độc tố bệnh bạch cầu, chuỗi nội độc tố A (từ Pseudomonas aeruginosa), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modecxin A, alpha-sarxin, Aleurites fordii protein, dianthin protein, Phytolaca americana protein (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế momordica charantia, curxin, crotin, chất ức chế sapaonaria officinalis, gelonin, mitogelin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin và tricothexen. Xem, ví dụ, WO 93/21232 được công bố ngày 28/10/1993.

Sáng chế còn đề xuất liên hợp miễn dịch được tạo thành giữa kháng thể và hợp chất với hoạt tính phân giải nhân (ví dụ, ribonucleaza hoặc ADN endonucleaza như deoxyribonucleaza; DNaza).

Theo một số phương án, liên hợp miễn dịch bao gồm nguyên tử phóng xạ ở mức cao. Nhiều chất đồng vị phóng xạ là hiện có để sản xuất kháng thể được liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các chất đồng vị phóng xạ của Lu. Khi liên hợp miễn dịch được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm nguyên tử phóng xạ đối với các nghiên cứu nhấp nháy, ví dụ tc^{99m} hoặc I^{123}, hoặc chất đánh dấu quay để tạo hình ảnh cộng hưởng từ nhân (NMR) (cũng đã biết là hình ảnh cộng hưởng từ, mri), như iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolin, mangan hoặc sắt. Các chất đánh dấu phóng xạ hoặc chất đánh dấu khác trong liên hợp miễn dịch trong các thử nghiệm đã biết. Ví dụ, peptit có thể được sinh tổng hợp hoặc có thể được tổng hợp bằng tổng hợp axit amin hoá học bằng cách sử dụng các tiền chất axit amin thích hợp bao gồm, ví dụ, flo-19 ở vị trí của hydro. Các chất đánh dấu như tc^{99m} hoặc I^{123}, Re^{186}, Re^{188} và In^{111} có thể được gắn vào qua gốc xystein ở peptit. Ytri-90 có thể được gắn vào qua gốc lysin. Phương pháp IODOGEN (Fraker et al (1978) *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 80:

49-57 có thể kết hợp iot-123. "Monoclonal Antibodies in Immunoscintigraphy" (Chatal, CRC Press 1989) mô tả chi tiết các phương pháp khác.

Theo một số phương án, liên hợp miễn dịch có thể bao gồm kháng thể được liên hợp với enzym hoạt hoá tiền dược chất mà chuyển hoá tiền dược chất (ví dụ, chất hoá trị liệu peptidyl, xem WO 81/01145) thành dược chất hoạt hoá, như dược chất chống ung thư. Các thể liên hợp miễn dịch này là hữu ích trong điều trị tiền dược chất qua trung gian enzym phụ thuộc kháng thể ("ADEPT"). Các enzym mà có thể được liên hợp với kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, phosphataza kiềm, mà là hữu ích để chuyển hoá tiền dược chất chứa phosphat thành các dược chất tự do; các arylsulfataza, mà là hữu ích để chuyển hoá tiền dược chất chứa sulfat thành các dược chất tự do; xytosin deaminaza, mà hữu ích để chuyển hoá 5-floxytosin không độc tố thành dược chất chống ung thư, 5-flouraxil; proteaza, như serratia proteaza, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidaza và cathepsin (như cathepsin B và L), mà là hữu ích để chuyển hoá tiền dược chất chứa peptit thành tiền dược chất tự do; D-alanylcarboxypeptidaza, mà là hữu ích để chuyển hoá các tiền dược chất mà chứa các phần tử thế D-axit amin; các enzym phân tách carbohydrat như β-galactosidaza và neuraminidaza, mà là hữu ích để chuyển hoá các tiền dược chất được glycosyl hoá thành các dược chất tự do; β-lactamaza, mà là hữu ích để chuyển hoá các dược chất được tạo dẫn xuất với β-lactam thành các dược chất tự do; và penixilin amidaza, như penixilin V amidaza và penixilin G amidaza, mà là hữu ích để chuyển hoá các dược chất được tạo dẫn xuất ở các nitơ amin của chúng với các nhóm phenoxyaxetyl hoặc phenylaxetyl, tương ứng, thành các dược chất tự do. Enzym có thể được gắn kết cộng hoá trị với kháng thể bằng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực này. Xem, ví dụ, Neuberger et al., *Nature* 312:604-608 (1984).

d. Lượng dược chất

Lượng dược chất được thể hiện bởi p và là số phần dược chất trung bình/kháng thể trong phân tử có công thức I. Lượng dược chất có thể nằm trong khoảng từ 1 đến 20 phần dược chất (D)/kháng thể. ADC có công thức I bao gồm gom các kháng thể được liên hợp với khoảng của các phần dược chất, từ 1 đến 20. Số lượng phần dược chất trung bình/kháng thể trong chế phẩm chứa ADC từ các phản ứng liên hợp có thể được đặc trưng bởi các phương pháp thông thường như quang phổ khối, thử nghiệm

ELISA và HPLC. Sự phân phát lượng ADC trong giới hạn p cũng có thể được xác định. Trong một số ví dụ, phân tách, tinh chế và đặc trưng hoá của ADC đồng nhất trong đó p là một số giá trị từ ADC với lượng dược chất khác có thể đạt được bằng các phương pháp như HPLC pha ngược hoặc điện di. Các thể liên hợp dược phẩm có công thức I kháng thể-dược chất do đó có thể là hỗn hợp không đồng nhất gồm các thể liên hợp này với các kháng thể được liên kết với 1, 2, 3, 4, hoặc nhiều phần dược chất.

Đối với một số thể liên hợp kháng thể-dược chất, p có thể được giới hạn bởi số lượng vị trí gắn trên kháng thể. Ví dụ, trong đó việc gắn là xystein thiol, như các phương án ví dụ trên đây, kháng thể chỉ có thể có một hoặc một vài nhóm xystein thiol hoặc có thể chỉ có một hoặc một vài nhóm thiol phản ứng đáng kể thông qua đó cầu liên kết có thể được gắn vào. Theo một số phương án, lượng dược chất lớn hơn, ví dụ p >5, có thể gây tích tụ, không hoà tan, độc tố hoặc mất khả năng thấm tế bào của một số thể liên hợp kháng thể-dược chất. Theo một số phương án, lượng dược chất đối với ADC theo sáng chế nằm trong khoảng từ 1 đến 8; từ 2 đến 6; hoặc từ 3 đến 5. Thực vậy, đã thể hiện rằng đối với một số ADC, tỷ lệ tối ưu của các phần dược chất/kháng thể có thể ít hơn 8, và có thể là khoảng từ 2 đến 5. Xem US 2005-0238649 Al.

Theo một số phương án, lượng tối đa các phần dược chất ít hơn theo lý thuyết được liên hợp với kháng thể trong thời gian phản ứng liên hợp. kháng thể có thể chứa, ví dụ, các gốc lysin mà không phản ứng với chất trung gian dược chất cầu liên kết hoặc chất phản ứng cầu liên kết, như được mô tả dưới đây. Thông thường, các kháng thể không chứa nhiều nhóm xystein thiol tự do và phản ứng mà có thể được liên kết với phần dược chất; thực tế là hầu hết các gốc xystein thiol trong kháng thể tồn tại như là cầu disulfua. Theo một số phương án, kháng thể có thể được khử với chất khử như dithiothreitol (DTT) hoặc tricarbonyletylphosphin (TCEP), dưới các điều kiện khử một phần hoặc hoàn toàn, để sinh ra các nhóm xystein thiol phản ứng. Theo một số phương án, kháng thể được cho vào các điều kiện làm biến tính đối với một vài nhóm ưa nhân phản ứng như lysin hoặc xystein.

Lượng (tỷ lệ dược chất/kháng thể) của ADC có thể được kiểm soát theo nhiều cách khác nhau, ví dụ, bằng cách: (i) giới hạn lượng dư mol chất trung gian dược chất-cầu liên kết hoặc chất phản ứng cầu liên kết so với kháng thể, (ii) giới hạn thời gian hoặc nhiệt độ phản ứng liên hợp và (iii) các điều kiện thử một phần hoặc giới hạn để cải biến xystein thiol.

Sẽ được hiểu rằng khi nhiều hơn một nhóm ưa nhân phản ứng với chất trung gian dược chất cầu liên kết hoặc chất phản ứng cầu liên kết tiếp theo bởi chất phản ứng cầu dược chất, sau đó sản phẩm thu được là hỗn hợp gồm các hợp chất ADC với sự phân bố của một hoặc nhiều phần dược chất được gắn kèm với kháng thể. Số lượng trung bình các dược chất /kháng thể có thể được tính toán từ hỗn hợp bởi thử nghiệm kháng thể ELISA, mà đặc hiệu đối với kháng thể và đặc hiệu đối với dược chất. Các phân tử ADC riêng rẽ có thể được xác định trong hỗn hợp bằng quang phổ khối và được tách bởi HPLC, ví dụ sắc ký tương tác kỵ nước (xem, ví dụ, McDonagh et al (2006) Prot. Engr. Design & Selection 19(7):299-307; Hamblett et al (2004) Clin. Cancer Res. 10:7063-7070; Hamblett, K.J., et al. "Effect of drug loading on the pharmacology, pharmacokinetics, and toxicity of an anti-CD30 antibody drugs conjugate," Abstract No. 624, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004; Alley, S.C., et al. "Controlling the location of drug attachment in antibody drugs conjugates," Abstract No. 627, American Association for Cancer Research, 2004 Annual Meeting, March 27-31, 2004, Proceedings of the AACR, Volume 45, March 2004). Theo một số phương án, ADC đồng nhất với gí trị nạp đơn có thể được phân lập từ hỗn hợp liên hợp bằng cách điện di hoặc sắc ký.

e. Một số phương pháp sản xuất liên hợp miễn dịch

ADC có công thức I có thể được sản xuất bằng một vài đường bằng cách dùng các phản ứng hữu cơ, các điều kiện và các chất phản ứng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, bao gồm: (1) phản ứng của nhóm ưa nhân của kháng thể với chất phản ứng cầu liên kết hoá trị hai để tạo thành Ab-L qua liên kết cộng hoá trị, tiếp theo bằng phản ứng với phần dược chất D; và (2) phản ứng của nhóm ưa nhân của phần dược chất với chất phản ứng cầu liên kết hoá trị hai, để tạo thành D-L, qua liên kết cùng hoá trị, tiếp theo bằng phản ứng với nhóm ưa nhân của kháng thể. Các phương pháp mẫu để điều chế ADC có công thức I qua đường sau như được mô tả trong US 20050238649 Al.

Các nhóm ưa nhân trên kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến: (i) các nhóm amin tận cùng N, (ii) các nhóm amin chuỗi phụ, ví dụ lysin, (iii) nhóm thiol chuỗi phụ, ví dụ xystein, và (iv) đường hydroxyl hoặc nhóm amino trong đó kháng thể này được glycosyl hoá. Các nhóm amin, thiol, và hydroxyl là ưa nhân và có khả năng phản ứng để tạo thành các liên kết cùng hoá trị với các nhóm ái lực điện tử trên các phần cầu liên kết và các chất phản ứng cầu liên kết bao gồm: (i) các este hoạt tính như

NHS este, HOBt este, haloformat và axit halogenua; (ii) alkyl và benzyl halogenua như haloaxetamit; (iii) aldehyt, keton, carboxyl, và các nhóm maleimit. Một số kháng thể có các disulfua trong chuỗi có thể khử, nghĩa là các cầu xystein. Các kháng thể có thể được tạo thành phản ứng để liên hợp với các chất phản ứng cầu liên kết bằng cách xử lý với chất phản ứng khử như DTT (dithiothreitol) hoặc tricarbonyletylphosphin (TCEP), sao cho kháng thể là được khử toàn bộ chiều dài hoặc một phần. Mỗi cầu liên kết xystein do đó tạo thành, theo lý thuyết, hai thiol ưa nhân phản ứng. Các nhóm ưa nhân bổ sung có thể được đưa vào thông qua cải biến các gốc lysin, ví dụ, bằng cách cho các gốc lysin phản ứng với 2-iminothiolan (chất phản ứng Traut), dẫn đến chuyển hoá amin thành thiol. Các nhóm thiol phản ứng có thể được đưa vào kháng thể bằng cách đưa một, hai, ba, bốn hoặc nhiều gốc xystein (ví dụ, bằng cách điều chế các kháng thể biến thể bao gồm một hoặc nhiều xystein axit amin không nguyên gốc).

Thể liên hợp kháng thể-dược chất theo sáng chế cũng có thể được sản xuất bằng phản ứng giữa nhóm ái lực điện tử trên kháng thể, như nhóm aldehyt hoặc keton carbony, với nhóm ưa nhân trên chất phản ứng cầu liên kết hoặc dược chất. Các nhóm ưa nhân hữu ích trên chất phản ứng cầu liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, hydrazit, oxim, amino, hydrazin, thiosemicarbazon, hydrazin carboxylat, và arylhydrazit. Theo một phương án, kháng thể được cải biến để đưa các phần ái lực điện tử mà có khả năng phản ứng với các phần tử thế ưa nhân trên chất phản ứng cầu liên kết hoặc dược chất. Theo phương án khác, đường của kháng thể được glycosyl hoá có thể được oxy hoá, ví dụ với chất phản ứng oxy hoá periodat, để tạo thành các nhóm aldehyt hoặc keton mà có thể phản ứng với nhóm amin của chất phản ứng cầu liên kết hoặc phần dược chất. Các nhóm bazơ Schiffimin thu được có thể tạo thành liên kết ổn định hoặc có thể được khử, ví dụ bằng các chất phản ứng bohydrua để tạo thành liên kết imin ổn định. Theo một phương án, phản ứng của phần carbohydrat của kháng thể được glycosyl hoá với galactoza oxidaza hoặc natri meta-periodat có thể thu được các nhóm carbonyl (aldehyt và keton) trong kháng thể mà có khả năng phản ứng với các nhóm thích hợp trên dược chất (Hermanson, Bioconjugate Techniques). Theo phương án khác, các kháng thể chứa serin tận cùng N hoặc các gốc threonin có thể phản ứng với natri meta-periodat, dẫn đến tạo ra aldehyt thay thế cho axit amin thứ nhất (Geoghegan & Stroh, (1992) Bioconjugate Chem. 3:138-146; US 5362852). Aldehyt này có thể được phản ứng với phần dược chất hoặc cầu liên kết ưa nhân.

Các nhóm ưa nhân trên phần dược chất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến: amin, thiol, hydroxyl, hydrazit, oxim, hydrazin, thiosemicarbazon, hydrazin carboxylat, và các nhóm arylhydrazit của phản ứng để tạo thành các liên kết cùng hoá trị với các nhóm ái lực điện tử trên các phần cầu liên kết và các chất phản ứng cầu liên kết bao gồm: (i) các este hoạt hoá như NHS este, HOBt este, haloformat, và axit halogenua; (ii) alkyl và benzyl halogenua như haloaxetamit; (iii) aldehyt, keton, carboxyl, và các nhóm maleimit.

Các hợp chất theo sáng chế đề cập rõ ràng, nhưng không chỉ giới hạn đến, ADC được điều chế với các chất phản ứng cầu liên kết liên kết ngang sau đây: BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMCC, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (Sucxinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoat) mà hiện có bán trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A; xem các trang 467-498, 2003-2004 Applications Handbook and Catalog.

Liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể và chất độc tế bào cũng có thể được bào chế bằng cách sử dụng nhiều chất cặp đôi protein hai chức như N-Sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), Sucxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của các imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt hoá (như disucxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), các diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất bis-flo hoạt hoá (như 1,5-diflo- 2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong Vitetta et al., Science 238:1098 (1987). Axit cacbon-14-l-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminepentaaxetic được đánh dấu (MX-DTPA) là chất tạo chelat ví dụ đối với liên hợp của nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO94/11026.

Theo cách khác, protein dung hợp bao gồm kháng thể và chất độc tế bào có thể được điều chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật tái tổ hợp hoặc tổng hợp peptit. Phân tử ADN tái tổ hợp có thể bao gồm các vùng mã hoá kháng thể và các phần độc tố tế bào của liên hợp liền kề với nhau hoặc tách riêng bởi vùng mã hoá cầu liên kết peptit mà không phá vỡ các đặc tính liên hợp mong muốn.

Theo phương án khác nữa, kháng thể có thể được liên hợp với "thụ thể" (như streptavidin) để ứng dụng trong tạo đích trước khối u trong đó liên hợp kháng thể thụ thể được dùng cho người bệnh, tiếp theo bằng cách loại bỏ liên hợp không được gắn kết khỏi chu trình bằng cách sử dụng chất làm sạch và sau đó dùng "phối tử" (ví dụ, avidin) mà được liên hợp với chất độc tế bào (ví dụ, nucleotit phóng xạ).

Các thể liên hợp miễn dịch ví dụ – Các thể liên hợp Thio-Kháng thể dược chất

a. Sản xuất kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b

ADN mã hoá biến thể trình tự axit amin của kháng thể được xử lý bởi xystein kháng CD79b và kháng thể ban đầu kháng CD79b theo sáng chế được sản xuất bằng nhiều phương pháp mà bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, phân lập từ nguồn tự nhiên (trong trường hợp của các biến thể trình tự axit amin xuất hiện tự nhiên), sản xuất bằng cách đột biến gen định hướng vị trí (hoặc qua trung gian oligonucleotit) (Carter (1985) et al Nucleic Acids Res. 13:4431-4443; Ho et al (1989) Gene (Amst.) 77:51-59; Kunkel et al (1987) Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:488; Liu et al (1998) J. Biol. Chem. 273:20252-20260), đột biến gen PCR (Higuchi, (1990) in PCR Protocols, pp.177-183, Academic Press; Ito et al (1991) Gene 102:67-70; Bernhard et al (1994) Bioconjugate Chem. 5:126-132; và Vallette et al (1989) Nuc. Acids Res. 17:723-733), và đột biến gen cát xét (Wells et al (1985) Gene 34:315-323) của ADN được sản xuất sớm hơn mã hoá polypeptit. Phương pháp đột biến gen, kit và các chất phản ứng là hiện có bán trên thị trường, ví dụ QuikChange® Multi Site-Direct Mutagenesis Kit (Stratagene, La Jolla, CA). Các đột biến đơn cũng được tạo ra bởi đột biến gen trực tiếp oligonucleotit bằng cách sử dụng plasmit ADN sợi kép làm khung bởi đột biến gen dựa trên (Sambrook and Russel, (2001) Molecular Cloning: A Laboratory Manual, 3rd edition; Zoller et al (1983) Methods Enzymol. 100:468-500; Zoller, M.J. và Smith, M. (1982) Nucl. Acids Res. 10:6487-6500). Các biến thể của kháng thể tái tổ hợp có thể được tạo cấu trúc cũng bằng cách thể hiện mảnh giới hạn hoặc bởi PCR kéo dài chồng lên nhau với oligonucleotit tổng hợp. Các gen mồi đột biến mã hoá (các) thay thế mã bộ ba xystein. Các kỹ thuật đột biến gen tiêu chuẩn có thể được dùng để tạo ra ADN mã hoá các kháng thể được xử lý bởi xystein đột biến này (Sambrook et al Molecular Cloning, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, N.Y., 1989; và Ausubel et al Current Protocols

in Molecular Biology, Greene Publishing and Wiley-Interscience, New York, N.Y., 1993).

Kỹ thuật thể hiện thể thực khuẩn (McCafferty et al (1990) Nature 348:552-553) có thể được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng CD79b của người và các mảnh kháng thể *in vitro*, từ các kho gen miền biến đổi globulin miễn dịch (V) từ kháng thể cho không được tạo miễn dịch. Theo kỹ thuật này, các gen miền V kháng thể được tạo đơn dòng vào gen protein lớn hoặc nhỏ của thể thực khuẩn dạng sợi, như M13 hoặc fd, và được thể hiện như các mảnh kháng thể chức năng trên bề mặt của hạt thể thực khuẩn. Bởi vì hạt dạng sợi chứa bản sao ADN sợi đơn của hệ gen thể thực khuẩn, chọn lọc dựa trên các đặc tính chức năng của kháng thể cũng dẫn đến chọn lọc gen mã hoá kháng thể thể hiện các đặc tính này. Do đó, các mô phỏng thể thực khuẩn một số đặc tính của tế bào B (Johnson et al (1993) Current Opinion in Structural Biology 3:564-571; Clackson et al (1991) Nature, 352:624-628; Marks et al (1991) J. Mol. Biol. 222:581-597; Griffith et al (1993) EMBO J. 12:725-734; US 5565332; US 5573905; US 5567610; US 5229275).

Các kháng thể kháng CD79b có thể được tổng hợp về mặt hoá học bằng cách sử dụng phương pháp tổng hợp oligopeptit đã biết hoặc có thể được sản xuất và được tinh chế bằng cách sử dụng kỹ thuật tái tổ hợp. Trình tự axit amin thích hợp hoặc các phần của chúng, có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp peptit trực tiếp bằng cách sử dụng các kỹ thuật pha rắn (Stewart et al., Solid-Phase Peptide Synthesis, (1969)W.H. Freeman Co., San Francisco, CA; Merrifield, (1963) J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154). Tổng hợp protein *In vitro* có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường hoặc bằng cách tự đột biến. Tổng hợp pha rắn tự động có thể được kết thúc, ví dụ, bằng cách dùng axit amin bảo vệ t-BOC hoặc Fmoc và sử dụng Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) bằng cách sửdụng các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các phần khác nhau của kháng thể kháng CD79b hoặc CD79b polypeptit có thể được tổng hợp hoá học riêng rẽ và kết hợp bằng cách sử dụng các phương pháp hoá học hoặc enzym để sản xuất kháng thể kháng CD79b mong muốn hoặc CD79b polypeptit.

Các kỹ thuật khác nhau đã được phát triển để sản xuất các mảnh kháng thể. Theo truyền thống, các mảnh này được tạo dẫn xuất qua việc tiêu hoá bằng cách thuỷ phân protein của kháng thể nguyên vẹn (Morimoto et al (1992) Journal of Biochemical

and Biophysical Methods 24:107-117; và Brennan et al (1985) Science, 229:81), hoặc sản xuất trực tiếp bởi tế bào chủ tái tổ hợp. Fab, Fv và ScFv các mảnh kháng thể kháng CD79b có thể tất cả được biểu hiện ở và được tiết từ *E. coli*, do đó cho phép sản xuất dễ dàng lượng lớn các mảnh này. Các mảnh kháng thể có thể được phân lập từ thư viện thể hiện thể thực khuẩn được mô tả ở đây. Theo cách khác, các mảnh Fab'-SH có thể được thu hồi trực tiếp từ *E. coli* và cặp đôi hoá học để tạo thành các mảnh $F(ab')_2$ (Carter et al (1992) Bio/Technology 10:163-167), hoặc được phân lập trực tiếp từ môi trường tế bào chủ tái tổ hợp. kháng thể kháng CD79b có thể là mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) (WO 93/16185; US 5571894; US. 5587458). Mảnh kháng thể kháng CD79b cũng có thể là "kháng thể tuyến tính" (US 5641870). Các mảnh kháng thể tuyến tính này có thể là đơn đặc hiệu hoặc đặc hiệu kép.

Phần mô tả dưới đây đề cập cơ bản đến việc sản xuất kháng thể kháng CD79b bằng cách nuôi cấy tế bào được biến nạp hoặc được chuyển nhiễm với vectơ chứa kháng thể kháng CD79b mã hoá axit nucleic. ADN mã hoá kháng thể kháng CD79b có thể thu được từ thư viện ADN bổ trợ được sản xuất từ mô được cho là có ARN thông tin kháng thể kháng CD79b và biểu hiện nó ở mức có thể phát hiện. Do đó, kháng thể kháng CD79b của người hoặc CD79b polypeptit ADN có thể thu được thông thường từ thư viện ADN bổ trợ được sản xuất từ mô của người. kháng thể kháng CD79b mã hoá gen cũng có thể thu được từ thư viện gen hoặc bằng các quy trình tổng hợp đã biết (ví dụ, tổng hợp axit nucleic tự động).

Mô hình, chọn lọc và phương pháp sản xuất theo sáng chế còn có khả năng làm cho kháng thể kháng CD79b sinh xystein phản ứng với nhóm chứa ái lực điện tử. Các phương pháp này còn có khả năng làm cho kháng thể liên hợp hợp chất như thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) với các phân tử dược chất khác ở vị trí chọn lọc được xác định trước. Các gốc xystein trên bề mặt kháng thể cho phép liên hợp đặc hiệu với phần dược chất thông qua nhóm phản ứng thiol như maleimit hoặc haloaxetyl. Phản ứng ưa nhân của các chức thiol của gốc Cys với nhóm maleimit là khoảng 1000 lần lớn hơn so với các chức năng axit amin bất kỳ khác trong protein, như nhóm amino của gốc lysin hoặc nhóm amin tận cùng N. Các chức năng đặc hiệu thiol trong các chất phản ứng iodoaxetyl và maleimit có thể phản ứng với các nhóm amin, nhưng độ pH cao hơn (>9,0) và thời gian phản ứng lâu hơn là cần thiết (Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London). Lượng thiol tự do trong protein có thể được đánh giá bằng thử nghiệm Ellman tiêu chuẩn. Globulin miễn dịch M là ví dụ về tham biến liên kết disulfua, trong khi globulin miễn dịch G là

ví dụ về protein với các cầu disulfua nội tại liên kết các tiểu đơn vị với nhau. Trong các protein như khử disulfua liên kết với chất phản ứng như dithiothreitol (DTT) hoặc selenol (Singh et al (2002) Anal. Biochem. 304:147-156) là cần thiết để sinh ra thiol phản ứng tự do. Phương pháp này dẫn đến mất cấu trúc thứ ba của kháng thể đặc hiệu gắn kết kháng nguyên.

Thử nghiệm Pheselector (Phage ELISA for Selection of Reactive Thiols) cho phép phát hiện các nhóm xystein phản ứng trong kháng thể ở dạng thể thực khuẩn ELISA nhờ đó tham gia vào dự thảo kháng thể được xử lý bởi xystein (Junutula, J.R. et al. (2008) J Immunol Methods 332:41-52; WO 2006/034488; US 2007/0092940). kháng thể được xử lý bởi xystein được bao ngoài trên bề mặt giếng, tiếp theo bằng cách ủ với các hạt thể thực khuẩn, ngoài kháng thể thứ hai được đánh dấu HRP và phát hiện sự hấp thụ. Các protein đột biến được thể hiện trên thể thực khuẩn có thể được sàng lọc theo cách nhanh chóng, mạnh mẽ và số lượng lớn. Các thư viện kháng thể được xử lý bởi xystein có thể được tạo ra và được cho vào gắn kết chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp giống nhau để xác định khoảng vị trí phản ứng thích hợp của sự kết hợp Cys tự do từ các thư viện thể thực khuẩn protein ngẫu nhiên hoặc các protein khác. Kỹ thuật này bao gồm cho protein đột biến xystein được thể hiện trên thể thực khuẩn phản ứng với chất phản ứng ái lực hoặc nhóm thông báo mà cũng phản ứng thiol.

Thử nghiệm PHESELECTOR cho phép sàng lọc các nhóm phản ứng thiol trong kháng thể. Việc xác định biến thể A121C bằng phương pháp này là mẫu. Toàn bộ phân tử Fab có thể được tra cứu hiệu quả để xác định nhiều biến thể ThioFab hơn với các nhóm phản nứg thiol. Tham biến, tính dễ bị ảnh hưởng bề mặt phân đoạn, được dùng để xác định và định lượng tính dễ bị ảnh hưởng của dung môi với gốc axit amin trong polypeptit. Tính dễ bị ảnh hưởng bề mặt có thể được biểu hiện như diện tính bề mặt ($Å^2$) mà có thể được tiếp xúc bởi phân tử dung môi, ví dụ nước. Khoảng trống nước đang sử dụng là khoảng khối cầu bán kính 1,4Å. Phần mềm hiện có tự do hoặc có thể chuyển giao (Secretary to CCP4, Daresbury Laboratory, Warrington, WA4 4AD, United Kingdom, Fax: (+44) 1925 603825, hoặc bởi internet: www.ccp4.ac.uk/dist/html/INDEX.html) như CCP4 Suite của chương trình tinh thể học mà dùng thuật toán để tính toán tính dễ bị ảnh hưởng bề mặt của axit amin của protein với các kết hợp có nguồn gốc từ tinh thể học tia X đã biết ("The CCP4 Suite:

Programs for Protein Crystallography" (1994) Acta. Cryst. D50:760-763). Hai đơn vị phần mềm mà thực hiện tính toán tính dễ bị ảnh hưởng bề mặt là "AREAIMOL" và "SURFACE", dựa trên thuật toán của B.Lee and F.M.Richards (1971) J.Mol.Biol. 55:379-400. AREAIMOL xác định dung môi dễ bị ảnh hưởng bề mặt của protein như vị trí trung tâm của khí cầu dò (thể hiện là phân tử dung môi) như nó có vai trò trên bề mặt Van der Waals của protein. AREAIMOL tính toán dung môi dễ bị ảnh hưởng diện tích bề mặt bằng cách tạo ra các điểm bề mặt trên khí cầu kép dài khoảng mỗi nguyên tử (ở khoảng cách xa với tâm nguyên tử bằng với tổng nguyên tử và bán kính dò), và loại trừ vị trí nằm trong các khí cầu tương đương so với các nguyên tử lân cận. AREAIMOL tìm thấy dung môi dễ bị ảnh hưởng diện tích các nguyên tử trong sắp xếp kết hợp PDB và tổng kết diện tích dễ bị ảnh hưởng bởi gốc, bởi chuỗi và đối với toàn bộ phân tử. Các diện tích dễ bị ảnh hưởng (hoặc các diện tích khác nhau) đối với các nguyên tử riêng rẽ có thể trình bày sắp xếp sản lượng pseudo-PDB. AREAIMOL cho rằng các bán kính đơn đối với mỗi nguyên tử và chỉ nhận biết lượng giới hạn các yếu tố khác nhau.

AREAIMOL và SURFACE thông báo tính dễ bị ảnh hưởng tuyệt đối, nghĩa là số lượng Angstroms (A°) vuông. Tính dễ bị ảnh hưởng bề mặt phân đoạn được tính toán bằng cách tham khảo đến trạng thái tiêu chuẩn có liên quan đối với axit amin trong polypeptit. Tình trạng tham khảo là tripeptit Gly-X-Gly, trong đó X là axit amin quan tâm và tình trạng tham khảo sẽ là hình dáng 'kéo dài', nghĩa là tương tự trong sợi beta. Hình dáng kéo dài làm tối đa tính dễ bị ảnh hưởng của X. Diện tích có thể đi vào được tính toán được phân chia bởi diện tích có thể đi vào trong trạng thái tham khảo Gly-X-Gly tripeptit và báo cáo số thương, mà tính dễ bị ảnh hưởng phân đoạn. Phần trăm dễ bị ảnh hưởng là tính dễ bị ảnh hưởng phân đoạn được tăng gấp bội theo 100. Thuật toán mẫu khác để tính toán tính dễ bị ảnh hưởng bề mặt là dựa trên đơn vị SOLV của chương trình xsae (Broger, C, F. Hoffman-LaRoche, Basel) mà tính toán tính dễ bị ảnh hưởng phân đoạn của gốc axit amin với khối cầu nước trên sự kết hợp tia X của polypeptit. Tính dễ bị ảnh hưởng bề mặt phân đoạn đối với mỗi axit amin trong kháng thể có thể được tính toán bằng cách sử dụng thông tin cấu trúc tinh thể hiện có (Eigenbrot et al. (1993) J MoI Biol. 229:969-995).

ADN mã hoá kháng thể được xử lý bởi xystein được phân lập dễ dàng và được tạo trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng

các đầu dò oligonucleotit mà có khả năng gắn kết đặc hiệu với gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của các kháng thể của chuột). Các thể lai có tác dụng như là nguồn ADN này. Khi được phân lập, ADN có thể được đặt vào vectơ biểu hiện, mà sau đó được chuyển nhiễm vào các tế bào chủ như các tế bào E. coli, các tế bào COS của khỉ, các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung quốc (CHO) hoặc các tế bào chủ động vật có vú khác, như các tế bào myelin (US 5807715; US 2005/0048572; US 2004/0229310) mà không tạo ra protein kháng thể khác, để thu được tổng hợp các kháng thể đơn dòng trong các tế bào chủ tái tổ hợp.

Sau khi tạo mô hình và chọn lọc, kháng thể được xử lý bởi xystein, ví dụ ThioFabs, với các gốc Cys sinh ra, không cặp đôi phản ứng ở mức cao, "các axit amin xystein tự do", có thể được tạo ra bởi: (i) biểu hiện trong hệ vi khuẩn, ví dụ E. coli (Skerra et al (1993) Curr. Opinion in Immunol. 5:256-262; Plöckthun (1992) Immunol. Revs. 130: 151-188) hoặc hệ nuôi cấy tế bào động vật có vú (WO 01/00245), ví dụ các tế bào buồng trứng của chuột đồng trung Quốc (CHO); và (ii) tinh chế bằng cách sử dụng các kỹ thuật tinh chế protein thông thường (Lowman et al (1991) J. Biol. Chem. 266(17): 10982-10988).

Các nhóm Cys thiol được sinh ra phản ứng với các chất phản ứng cầu liên kết có ái lực điện tử và các chất trung gian dược chất cầu liên kết để tạo thành thể liên hợp kháng thể-dược chất sinh xystein và kháng thể được xử lý bởi xystein được đánh dấu khác. Các gốc Cys của kháng thể được xử lý bởi xystein, và có mặt trong kháng thể ban đầu, mà được cặp đôi và tạo thành các liên kết disulfua trong chuỗi không có các nhóm thiol phản ứng bất kỳ (trừ phi được xử lý với chất khử) và không phản ứng với chất liên kết cầu liên kết có ái lực điện tử hoặc các chất trung gian dược chất cầu liên kết. Gốc Cys được sinh ra mới, có thể không được cặp đôi và có khả năng phản ứng với, nghĩa là liên hợp với chất cầu liên kết ái lực điện tử hoặc chất trung gian dược chất cầu liên kết, như dược chất maleimit. Các chất trung gian dược chất cầu liên kết bao gồm: MC-MMAE, MC-MMAF, MC-vc-PAB-MMAE, và MC-vc-PAB-MMAF. Các vị trí cấu trúc của các gốc Cys được sinh ra của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đánh số theo hệ đánh số thứ tự. Hệ đánh số thứ tự này tương quan với hệ đánh số Kabat (Kabat et al., (1991) Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD) khởi đầu ở tận cùng N, khác với sơ đồ đánh số Kabat (hàng dưới) bằng cách lồng được ghi chú bởi

a,b,c. bằng cách sử dụng hệ đánh số Kabat, trình tự axit amin thẳng có thể chứa các axit amin ít hơn hoặc bổ sung tương ứng với việc rút ngắn hoặc chèn vào, FR hoặc CDR của miền biến đổi. Các vị trí biến thể chuỗi nặng sinh xystein được xác định bằng cách đánh số thứ tự và sơ đồ đánh số Kabat.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD79b sinh xystein được điều chế bằng quy trình bao gồm:

(a) thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin của kháng thể kháng CD79b bởi xystein; và

(b) xác định khả năng phản ứng thiol của kháng thể kháng CD79b sinh xystein bằng cách cho kháng thể được xử lý bởi xystein phản ứng với chất phản ứng thiol.

Kháng thể được xử lý bởi xystein có thể là kháng thể ban đầu phản ứng nhiều hơn với chất phản ứng thiol.

Gốc xystein tự do có thể được định vị trong các chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ hoặc trong các miền cố định và biến đổi. Các mảnh kháng thể, ví dụ Fab, cũng có thể được sinh ra với một hoặc nhiều axit amin xystein thay thế các axit amin của mảnh kháng thể, để tạo thành các mảnh kháng thể được xử lý bởi xystein.

Phương án khác theo sáng chế đề xuất phương pháp điều chế (sản xuất) kháng thể kháng CD79b sinh xystein, bao gồm:

(a) đưa một hoặc nhiều axit amin xystein vào kháng thể kháng CD79b ban đầu để sinh ra kháng thể kháng CD79b sinh xystein; và

(b) xác định khả năng phản ứng thiol của kháng thể được xử lý bởi xystein với chất phản ứng thiol; trong đó kháng thể được xử lý bởi xystein là phản ứng nhiều hơn kháng thể ban đầu với chất phản ứng thiol.

Bước (a) của phương pháp sản xuất kháng thể được xử lý bởi xystein có thể bao gồm:

(i) tạo đột biến trình tự axit nucleic mã hoá kháng thể được xử lý bởi xystein;

(ii) biểu hiện kháng thể được xử lý bởi xystein; và

(iii) phân lập và tinh chế kháng thể được xử lý bởi xystein.

Bước (b) của phương pháp điều chế kháng thể được xử lý bởi xystein có thể bao gồm biểu hiện kháng thể được xử lý bởi xystein trên hạt vi rút được chọn từ hạt thể thực khuẩn.

Bước (b) của phương pháp điều chế kháng thể được xử lý bởi xystein cũng có thể bao gồm:

(i) cho kháng thể được xử lý bởi xystein phản ứng với chất phản ứng ái lực thiol để sinh ra kháng thể được đánh dấu ái lực, sinh xystein; và

(ii) xác định sự gắn kết của kháng thể được đánh dấu ái lực, sinh xystein với môi trường bắt.

Phương án khác theo sáng chế là phương pháp sàng lọc kháng thể được xử lý bởi xystein với axit amin xystein phản ứng ở mức độ cao, không cặp đôi có khả năng phản ứng thiol bao gồm:

(a) đưa một hoặc nhiều axit amin xystein vào kháng thể ban đầu để sinh ra kháng thể được xử lý bởi xystein;

(b) cho kháng thể được xử lý bởi xystein phản ứng với chất phản ứng ái lực phản ứng thiol để tạo ra kháng thể được đánh dấu ái lực, sinh xystein; và

(c) xác định sự gắn kết của kháng thể được đánh dấu ái lực, sinh xystein với môi trường bắt; và

(d) xác định khả năng phản ứng thiol của kháng thể được xử lý bởi xystein với chất phản ứng thiol.

Bước (a) của phương pháp sàng lọc kháng thể được xử lý bởi xystein có thể bao gồm:

(i) tạo đột biến trình tự axit nucleic mã hoá kháng thể được xử lý bởi xystein;

(ii) biểu hiện kháng thể được xử lý bởi xystein; và

(iii) phân lập và tinh chế kháng thể được xử lý bởi xystein.

Bước (b) của phương pháp sàng lọc kháng thể được xử lý bởi xystein có thể bao gồm biểu hiện kháng thể được xử lý bởi xystein trên hạt vi rút được chọn từ hạt thể thực khuẩn.

Bước (b) của phương pháp sàng lọc kháng thể được xử lý bởi xystein cũng có thể bao gồm:

(i) cho kháng thể được xử lý bởi xystein phản ứng với chất phản ứng ái lực phản ứng thiol để sinh ra kháng thể được đánh dấu ái lực, sinh xystein; và

(ii) xác định sự gắn kết của kháng thể được đánh dấu ái lực, sinh xystein với môi trường bắt.

b. Các biến thể sinh xystein của IgG kháng CD79b

Xystein được đưa vào ở vị trí chuỗi nặng 118 (đánh số theo EU) (tương ứng với vị trí chuỗi nặng 118, đánh số trình tự) trong toàn bộ chiều dài, các kháng thể đơn dòng ban đầu khảm kháng CD79b hoặc ở chuỗi nhẹ 205 (đánh số Kabat) (tương ứng với chuỗi nhẹ 209, đánh số sau đó) vị trí trong toàn bộ chiều dài, kháng thể đơn dòng ban đầu khảm kháng CD79b bằng các phương pháp sinh xystein được mô tả ở đây.

Các kháng thể được xử lý bởi xystein với xystein ở chuỗi nặng 118 (đánh số EU) được tạo ra là: (a) thio-MA79b.v17-HC(A118C) với trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 228) và trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 229), Fig. 24; (b) thio-MA79b.v18-HC(A118C) với trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 230) và trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 231), Fig. 25; (c) thio-MA79b.v28-HC(A118C), với trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 232) và trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 233), Fig. 26; (d) thio-MA79b-HC(A118C) với trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 236) và trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 237), Fig. 28; và (e) thio-kháng-xynoCD79b-HC(A118C) với trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 244) và trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 245), Fig. 48.

Các kháng thể được xử lý bởi xystein với xystein ở chuỗi nhẹ 205 (đánh số Kabat) được sinh ra là: (a) thio-MA79b-LC(V205C) với trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 234) và trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 235), Fig. 27 và (b) thio-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-LC(V205C) với trình tự chuỗi nặng (SEQ ID NO: 299) và trình tự chuỗi nhẹ (SEQ ID NO: 300), Fig. 49.

Các kháng thể đơn dòng sinh xystein được biểu hiện ở tế bào CHO (Chinese Hamster Ovary) bằng cách lên men tạm thời ở môi trường chứa 1mM xystein.

Theo một phương án, kháng thể được xử lý bởi xystein MA79b được làm thích hợp với người kháng CD79b bao gồm một hoặc nhiều trình tự chuỗi nặng sau đây với axit amin xystein tự do (SEQ ID NOs: 251-259, Bảng 2).

Bảng 2: So sánh trình tự chuỗi nặng, đánh số Kabat và EU đối với các biến thể kháng thể được xử lý bởi xystein MA79b được làm thích hợp với người kháng CD79b

Trình tự	**Đánh số trình tự**	**Đánh số KABAT**	**Đánh số EU**	**SEQ ID NO:**
EVQLCESGGG	V5C	V5C		251
LRLSCCASGYT	A23C	A23C		252
MNSLRCEDTAV	A88C	A84C		253
TLVTVCSASTK	S116C	S112C		254
VTVSSCSTKGP	A118C	A114C	A118C	255
VSSASCKGPSV	T120C	T116C	T120C	256
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C	V282C	257
KGFYPCDIAVE	S375C	S371C	S375C	258
PPVLDCDGSFF	S400C	S396C	S400C	259

Theo một phương án, các kháng thể được xử lý bởi xystein MA79b kháng CD79b bao gồm một hoặc nhiều trình tự chuỗi nặng sau đây với axit amin xystein tự do (SEQ ID NOs: 260-268, Bảng 3).

Bảng 3: So sánh trình tự chuỗi nặng, đánh số Kabat và EU đối với các biến thể kháng thể sinh chMA79b xystein kháng CD79b:

Trình tự	**Đánh số trình tự**	**Đánh số KABAT**	**Đánh số EU**	**SEQ ID NO:**
EVQLCQSGAE	Q5C	Q5C		260
VKISCCATGYT	K23C	K23C		261
LSSLTCEDSAV	S88C	S84C		262
TSVTVCSASTK	S116C	S112C		263
VTVSSCSTKGP	A118C	A114C	A118C	264
VSSASCKGPSV	T120C	T116C	T120C	265
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C	V282C	266
KGFYPCDIAVE	S375C	S371C	S375C	267
PPVLDCDGSFF	S400C	S396C	S400C	268

Theo một phương án, các kháng thể kháng CD79b sinh xystein kháng xynoCD79b(ch10D10) bao gồm một hoặc nhiều các trình tự chuỗi nặng sau đây với axit amin xystein (SEQ ID NOs: 269-277, Bảng 4).

Bảng 4: So sánh trình tự chuỗi nặng, đánh số Kabat và EU đối với các biến thể kháng thể kháng CD79b sinh xystein kháng xynoCD79b(ch10D10):

Trình tự	**Đánh số trình tự**	**Đánh số KABAT**	**Đánh số EU**	**SEQ ID NO:**
EVQLCESGPG	Q5C	Q5C		269
LSLTCCVTGYS	T23C	T23C		270
LNSVTCEDTAT	S88C	S84C		271
TTLTVCSASTK	S111C	S112C		272
LTVSSCSTKGP	A113C	A114C	A118C	273
VSSASCKGPSV	T115C	T116C	T120C	274
WYVDGCEVHNA	V282C	V278C	V282C	275
KGFYPCDIAVE	S370C	S371C	S375C	276
PPVLDCDGSFF	S395C	S396C	S400C	277

Theo một phương án, kháng thể được xử lý bởi xystein MA79b được làm thích hợp với người kháng CD79b bao gồm một hoặc nhiều trình tự chuỗi nhẹ sau đây với axit amin xystein (SEQ ID NOs: 278-284, Bảng 5).

Bảng 5: So sánh trình tự chuỗi nhẹ và đánh số Kabat đối với các biến thể kháng thể được xử lý bởi xystein MA79b được làm thích hợp với người kháng CD79b

Trình tự	**Đánh số trình tự**	**Đánh số KABAT**	**SEQ ID NO:**
SLSASCGDRVT	V15C	V15C	278
EIKRTCAAPSV	V114C	V110C	279
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	280
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	281
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	282
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	283
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	284

Theo một phương án, các kháng thể được xử lý bởi xystein MA79b khảm kháng CD79b bao gồm một hoặc nhiều trình tự chuỗi nhẹ sau đây với axit amin xystein (SEQ ID NOs: 285-291, Bảng 6).

Bảng 6: So sánh trình tự chuỗi nhẹ và đánh số Kabat đối với các biến thể kháng thể được xử lý bởi xystein MA79b khảm kháng CD79b

Trình tự	**Đánh số trình tự**	**Đánh số KABAT**	**SEQ ID NO:**
SLAVSCGQRAT	L15C	L15C	285
ELKRTCAAPSV	V114C	V110C	286
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	287
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	288
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	289
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	290
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	291

Theo một phương án, các kháng thể kháng CD79b sinh xystein kháng xynoCD79b(ch10D10) bao gồm một hoặc nhiều trình tự chuỗi nhẹ sau đây với axit amin xystein tự do (SEQ ID NOs: 292-298, Bảng 7).

Bảng 7: So sánh trình tự chuỗi nhẹ và đánh số Kabat đối với các biến thể kháng thể kháng CD79b sinh xystein kháng xynoCD79b(ch10D10)

Trình tự	**Đánh số trình tự**	**Đánh số KABAT**	**SEQ ID NO:**
SLAVSCGQRAT	L15C	L15C	292
EIKRTCAAPSV	V114C	V110C	293
TVAAPCVFIFP	S118C	S114C	294
FIFPPCDEQLK	S125C	S121C	295
DEQLKCGTASV	S131C	S127C	296
VTEQDCKDSTY	S172C	S168C	297
GLSSPCTKSFN	V209C	V205C	298

c. Kháng thể kháng CD79b sinh xystein được đánh dấu

Kháng thể kháng CD79b sinh xystein có thể được cặp đôi đặc hiệu vị trí và có hiệu quả với chất phản ứng thiol. Chất phản ứng thiol có thể là chất phản ứng cầu liên kết đa chức, bắt giữ, nghĩa là ái lực, chất phản ứng đánh dấu (ví dụ chất cầu liên kết biotin), đánh dấu phát hiện (ví dụ chất phản ứng flopho), chất ổn định hoá pha rắn (ví dụ SEPHAROSE™, polystyren, hoặc thuỷ tinh), hoặc chất trung gian dược chất cầu liên kết. Một ví dụ về chất phản ứng thiol là N-etyl maleimit (NEM). Theo phương án ví dụ, phản ứng của ThioFab với chất phản ứng cầu liên kết biotin tạo ra ThioFab được biotinyl hoá bởi sự có mặt và khả năng phản ứng của gốc xystein được sinh ra có thể được phát hiện và được xác định. Phản ứng của ThioFab với chất phản ứng cầu liên kết đa chức tạo ra ThioFab với cầu liên kết được tạo chức năng mà còn có thể được phản ứng với chất phản ứng phần dược chất hoặc đánh dấu khác. Phản ứng của ThioFab với chất trung gian dược chất cầu liên kết tạo ra thể liên hợp ThioFab dược chất.

Các phương pháp ví dụ được mô tả ở đây có thể thường được áp dụng để xác định và sản xuất kháng thể và thông thường hơn là, đối với protein khác thông qua việc áp dụng các bước dự định và sàng lọc được mô tả ở đây.

Phương pháp này có thể được áp dụng để liên hợp các chất phản ứng thiol khác trong đó nhóm phản ứng là, ví dụ, maleimit, iodoaxetamit, pyridyl disulfua hoặc chất liên hợp phản ứng thiol khác (Haugland, 2003, Molecular Probes Handbook of Fluorescent Probes and Research Chemicals, Molecular Probes, Inc.; Brinkley, 1992, Bioconjugate Chem. 3:2; Garman, 1997, Non-Radioactive Labelling: A Practical Approach, Academic Press, London; Means (1990) Bioconjugate Chem. 1 :2; Hermanson, G. in Bioconjugate Techniques (1996) Academic Press, San Diego, pp. 40-55, 643-671). Chất phản ứng thiol có thể là phần dược chất, flopho như thuốc nhuộm huỳnh quang tương tự floretxein hoặc rođamin, chất tạo chelat để tạo hình ảnh hoặc kim loại điều trị phóng xạ, đánh dấu peptidyl hoặc không peptidyl tag phát hiện hoặc chất cải biến rõ ràng như các chất đồng phân khác của polyetylene glycol, peptit mà gắn kết với hợp phần thứ ba hoặc carbohydrat khác hoặc chất ưa lipit.

d. Sử dụng kháng thể kháng CD79b sinh xystein

Kháng thể kháng CD79b sinh xystein, và các thể liên hợp của chúng có thể phát hiện sử dụng làm các chất điều trị và/hoặc chẩn đoán. Sáng chế còn đề xuất phương pháp ngăn ngừa, quản lý, điều trị hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệu chứng liên quan đến rối loạn liên quan đến tế bào B. Cụ thể là, sáng chế đề xuất phương pháp ngăn ngừa, quản lý, điều trị hoặc cải thiện một hoặc nhiều triệc chứng liên quan đến rối loạn tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư, ví dụ, u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm chiếm, NHL xâm chiếm tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, khối u bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào lympho tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL) và bệnh bạch cầu tế bào vỏ. Sáng chế vẫn còn đề xuất phương pháp chẩn đoán rối loạn liên quan đến CD79b hoặc có xu hướng phát triển rối loạn này, cũng như các phương pháp xác định các kháng thể và các mảnh gắn kết kháng nguyên của kháng thể, mà tốt hơn là gắn kết tế bào B liên quan đến CD79b polypeptit.

Phương án khác theo sáng chế là đề xuất sự sử dụng kháng thể kháng CD79b sinh xystein để sản xuất thuốc hữu ích trong điều trị tình trạng bệnh mà đáp với với rối loạn liên quan đến tế bào B.

e. Các thể liên hợp kháng thể-dược chất sinh xystein (các thể liên hợp Thio-kháng thể dược chất (TDC))

Khía cạnh khác theo sáng chế là thể liên hợp kháng thể-dược chất bao gồm kháng thể kháng CD79b sinh xystein (Ab), và phần dược chất auristatin (D) trong đó kháng thể được xử lý bởi xystein được gắn vào thông qua một hoặc nhiều axit amin xystein tự do bởi phần cầu liên kết (L) với D; hợp chất có công thức I:

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad I$$

trong đó p là 1, 2, 3, hoặc 4; và trong đó kháng thể được xử lý bởi xystein được sản xuất bởi quy trình bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin của kháng thể ban đầu kháng CD79b bởi một hoặc nhiều axit amin xystein tự do.

Khía cạnh khác của sáng chế là chế phẩm bao gồm hỗn hợp gồm các hợp chất kháng thể-dược chất có công thức I trong đó lượng dược chất trung bình/kháng thể là khoảng từ 2 đến 5 hoặc khoảng từ 3 đến 4.

Các Fig. 24-28 và 48-49 thể hiện các phương án về các thể liên hợp kháng thể-dược chất kháng CD79b sinh xystein (ADC) trong đó phần dược chất auristatin được gắn vào nhóm xystein được sinh ra ở: chuỗi nhẹ (LC-ADC) hoặc chuỗi nặng (HC-ADC).

Các thuận lợi hiệu lực của các thể liên hợp kháng thể-dược chất kháng CD79b sinh xystein bao gồm tính an toàn được cải thiện (chỉ số điều trị lớn hơn), các tham biến PK được cải thiện, các liên kết disulfua trong chuỗi kháng thể được duy trì trong đó có thể làm ổn định liên hợp và duy trì hình dạng gắn kết hoạt tính của nó, các vị trí của hình dạng dược chất được xác định và việc sản xuất các thể liên hợp kháng thể-dược chất sinh xystein từ việc kết hợp các kháng thể được xử lý bởi xystein với các chất phản ứng cầu liên kết dược chất dẫn đến sản phẩm đồng nhất hơn.

Cầu liên kết

"Cầu liên kết", "đơn vị cầu liên kết", hoặc "liên kết" có nghĩa là phần hoá học bao gồm liên kết cộng hoá trị hoặc chuỗi nguyên tử mà gắn kết cộng hoá trị kháng thể với phần dược chất. Theo các phương án khác nhau, các cầu liên kết đặc hiệu như L. "Cầu liên kết" (L) là phần hai chức hoặc đa chức mà có thể được sử dụng để liên kết một hoặc nhiều phần dược chất (D) và đơn vị kháng thể (Ab) để tạo thành thể liên hợp

kháng thể-dược chất (ADC) có công thức I. Các thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) có thể được sản xuất thông thường bằng cách sử dụng Cầu liên kết có chức năng phản ứng để gắn kết với dược chất và với kháng thể. Xysteine thiol của kháng thể được xử lý bởi xystein (Ab) có thể tạo thành liên kết với nhóm chức ái điện tử của chất phản ứng cầu liên kết, phần dược chất hoặc chất trung gian dược chất-cầu liên kết.

Theo một khía cạnh, cầu liên kết có vị trí phản ứng có nhóm ái điện tử mà phản ứng với xystein ưa nhân có mặt trên kháng thể. Xystein thiol của kháng thể là phản ứng với nhóm ái điện tử trên cầu liên kết và tạo thành liên kết cộng hoá trị với cầu liên kết. Các nhóm ái điện tử hữu ích bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các nhóm maleimit và haloaxetamit.

Các cầu liên kết bao gồm gốc hoá trị hai như alkyldiyl, arylen, heteroarylen, các phần như: $-(CR_2)_nO(CR_2)_n-$, các đơn vị lặp lại của alkyloxy (ví dụ polyetylenoxy, PEG, polymetyleneoxy) và alkylamino (ví dụ polyetylenamino, Jeffamine); và este của diaxit và amit bao gồm sucxinat, sucxinamit, diglycolat, malonat và caproamit.

Các kháng thể được xử lý bởi xystein phản ứng với các chất phản ứng cầu liên kết hoặc các chất trung gian dược chất-cầu liên kết, với các nhóm chức ái điện tử như maleimit hoặc -halo carbonyl, theo phương pháp liên hợp ở trang 766 của Klussman, et al (2004), Bioconjugate Chemistry 15(4):765-773, và theo phương pháp của Ví dụ 6.

Cầu liên kết có thể bao gồm một hoặc nhiều hợp phần cầu liên kết. Các hợp phần cầu liên kết ví dụ bao gồm 6-maleimidocaproyl ("MC"), maleimidopropanoyl ("MP"), valin-xitrulin ("val-cit" hoặc "vc"), alanin-phenylalanin ("ala-phe" hoặc "af"), p-aminobenzyloxycarbonyl ("PAB"), N-sucxinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoat ("SPP") tạo ra gốc liên kết axit 4-mercaptopentanoic, N-sucxinimidyl 4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1 carboxylat ("SMCC') tạo ra gốc liên kết axit 4-((2,5-dioxopyrrolidin-1-yl)metyl)xyclohexancarboxylic, 2,5-dioxopyrrolidin-1-yl 4-(pyridin-2-yldisulfanyl) butanoat ("SPDB") tạo ra gốc liên kết axit 4-mercaptobutanoic, N-Sucxinimidyl (4-iodo-axetyl) aminobenzoat ("SIAB"), etyleneoxy $-CH_2CH_2O-$ như một hoặc nhiều đơn vị lặp lại ("EO" hoặc "PEO"). Các hợp phần cầu liên kết bổ sung là đã biết trong lĩnh vực này và một số được mô tả ở đây.

Theo một phương án, cầu liên kết L của ADC có công thức:

$$—A_a—W_w—Y_y–$$

trong đó:

-A- là đơn vị Stretcher được gắn kết cộng hoá trị với xystein thiol của kháng thể (Ab);

a là 0 hoặc 1;

mỗi -W- độc lập là đơn vị axit amin;

w độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12;

-Y- là đơn vị Spacer được gắn kết cộng hoá trị với phần dược chất; và

y là 0, 1 hoặc 2.

Đơn vị Stretcher

Đơn vị Stretcher (-A-), khi có mặt, có khả năng liên kết đơn vị kháng thể với đơn vị axit amin (-W-). Liên quan đến vấn đề này, kháng thể (Ab) có nhóm chức mà có thể tạo thành liên kết với nhóm chức của Stretcher. Các nhóm chức hữu ích mà có thể có mặt trên kháng thể, xuất hiện tự nhiên hoặc qua hoá học bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, sulfhydryl (-SH), amino, hydroxyl, carboxy, nhóm anome hydroxyl của carbohydrat và carboxyl. Theo một khía cạnh, các nhóm chức kháng thể là sulfhydryl hoặc amino. Các nhóm sulfhydryl có thể được sinh ra bằng cách khử liên kết disulfua nội phân tử của kháng thể. Theo cách khác, các nhóm sulfhydryl có thể được sinh ra bằng phản ứng của nhóm amin với phần lysin của kháng thể bằng cách sử dụng 2-iminothiolan (chất phản ứng Traut) hoặc chất phản ứng tạo ra sulfhydryl khác. Theo một phương án, kháng thể (Ab) có nhóm xystein thiol tự do có thể tạo thành liên kết với nhóm chức ái điện tử của đơn vị Stretcher. Các đoơ vị stretcher ví dụ trong các thể liên hợp có công thức I được mô tả bởi các công thức II và III, trong đó Ab-, -W-, -Y-, -D, w và y là như được xác định trên đây và R^{17} là gốc hoá trị hai được chọn từ $(CH_2)_r$, C_3-C_8 carboxyclyl, $O–(CH_2)_r$, arylen, $(CH_2)_r$–arylen, –arylen–$(CH_2)_r$–, $(CH_2)_r$–(C_3-C_8 carboxyclyl), (C_3-C_8 carboxyclyl)–$(CH_2)_r$, C_3-C_8 heteroxyclyl, $(CH_2)_r$–(C_3-C_8 heteroxyclyl), –(C_3-C_8 heteroxyclyl)–$(CH_2)_r$–, $–(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2)_r–$, $–(CH_2CH_2O)_r–$, $–(CH_2CH_2O)_r–CH_2–$,

$-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-$, $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH_2-$, và $-(CH_2CH_2O)_rC(O)NR^b(CH_2)_r-$; trong đó R^b là H, C_1-C_6 alkyl, phenyl, hoặc benzyl; và r độc lập là số nguyên nằm trong khoảng từ 1 đến 10.

Arylen bao gồm các gốc hydrocarbon thơm có hoá trị hai có từ 6 đến 20 nguyên tử cacbon thu được bằng cách loại bỏ hai nguyên tử hydro khỏi hệ vòng thơm. Các nhóm arylen thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các gốc có nguồn gốc từ benzen, benzyn được thế, naphtalen, anthraxen, biphenyl, và tương tự.

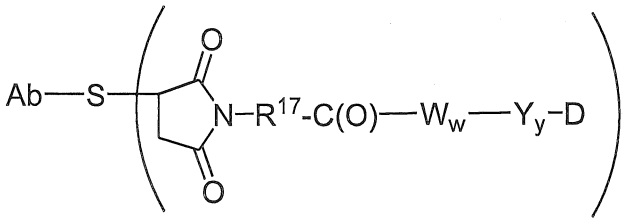
Các nhóm heteroxyclyl bao gồm hệ vòng trong đó một hoặc nhiều nguyên tử vòng là nguyên tử khác loại, ví dụ nitơ, oxy, và lưu huỳnh. Gốc dị vòng bao gồm từ 1 đến 20 nguyên tử cacbon và từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S. Dị vòng có thể là một vòng có từ 3 đến 7 cạnh vòng (từ 2 đến 6 nguyên tử cacbon và từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S) hoặc hai vòng có từ 7 đến 10 cạnh vòng (từ 4 đến 9 nguyên tử cacbon và từ 1 đến 3 nguyên tử khác loại được chọn từ N, O, P, và S), ví dụ: hệ bixyclo [4,5], [5,5], [5,6], hoặc [6,6]. Các dị vòng được mô tả trong Paquette, Leo A.; "Principles of Modern Heterocyclic Chemistry" (W.A. Benjamin, New York, 1968), cụ thể là các Chương 1, 3, 4, 6, 7, và 9; "The Chemistry of Heterocyclic Compounds, A series of Monographs" (John Wiley & Sons, New York, 1950 to present), cụ thể là các Tập 13, 14, 16, 19, và 28; và J. Am. Chem. Soc. (1960) 82:5566.

Các ví dụ về các dị vòng bao gồm nhằm ví dụ và không giới hạn pyridyl, dihydroypyridyl, tetrahydropyridyl (piperidyl), thiazolyl, tetrahydrothiophenyl, lưu huỳnh tetrahydrothiophenyl được oxy hoá, pyrimidinyl, furanyl, thienyl, pyrolyl, pyrazolyl, imidazolyl, tetrazolyl, benzofuranyl, thianaphthalenyl, indolyl, indolenyl, quinolinyl, isoquinolinyl, benzimidazolyl, piperidinyl, 4-piperidonyl, pyrolidinyl, 2-pyrolidonyl, pyrolinyl, tetrahydrofuranyl, bis-tetrahydrofuranyl, tetrahydropyranyl, bis-tetrahydropyranyl, tetrahydroquinolinyl, tetrahydroisoquinolinyl, decahydroquinolinyl, octahydroisoquinolinyl, azoxinyl, triazinyl, 6H-1,2,5-thiadiazinyl, 2H,6H-1,5,2-dithiazinyl, thienyl, thianthrenyl, pyranyl, isobenzofuranyl, chromenyl, xanthenyl, phenoxathinyl, 2H-pyrrolyl, isothiazolyl, isoxazolyl, pyrazinyl, pyridazinyl, indolizinyl, isoindolyl, 3H-indolyl, 1H-indazolyl, purinyl, 4H-quinolizinyl, phthalazinyl, naphthyridinyl, quinoxalinyl, quinazolinyl, xinnolinyl, pteridinyl, 4H-carbazolyl, carbazolyl, β-carbolinyl, phenanthridinyl, acridinyl, pyrimidinyl,

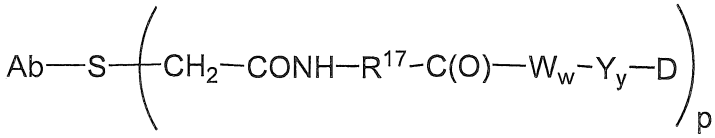
phenanthrolinyl, phenazinyl, phenothiazinyl, furazanyl, phenoxazinyl, isochromanyl, chromanyl, imidazolidinyl, imidazolinyl, pyrazolidinyl, pyrazolinyl, piperazinyl, indolinyl, isoindolinyl, quinuclidinyl, morpholinyl, oxazolidinyl, benzotriazolyl, benzisoxazolyl, oxindolyl, benzoxazolinyl, và isatinoyl.

Nhóm carboxyclyl bao gồm vòng no hoặc không no có từ 3 đến 7 nguyên tử cacbon như đơn vòng hoặc từ 7 đến 12 nguyên tử cacbon như hai vòng. Các vòng cacbon đơn vòng có từ 3 đến 6 nguyên tử vòng, vẫn thông thường hơn là 5 hoặc 6 nguyên tử vòng. Các vòng cacbon hai vòng có từ 7 đến 12 nguyên tử vòng, ví dụ được sắp xếp như hệ hai vòng [4,5], [5,5], [5,6] hoặc [6,6] hoặc 9 hoặc 10 nguyên tử vòng được sắp xếp như hệ hai vòng [5,6] hoặc [6,6]. Các ví dụ về các vòng cacbon hai vòng bao gồm xyclopropyl, xyclobutyl, xyclopentyl, 1-xyclopent-l-enyl, l-xyclopent-2-enyl, 1-xyclopent-3-enyl, xyclohexyl, 1-xyclohex-l-enyl, l-xyclohex-2-enyl, l-xyclohex-3-enyl, xycloheptyl, và xyclooctyl.

Sẽ được hiểu từ tất cả các phương án ví dụ có công thức I ADC như II- VI, mà trong đó không xác định cụ thể, từ 1 đến 4 phần dược chất được gắn kết với kháng thể (p = từ 1 đến 4), phụ thuộc vào số lượng các gốc xystein được sinh ra.

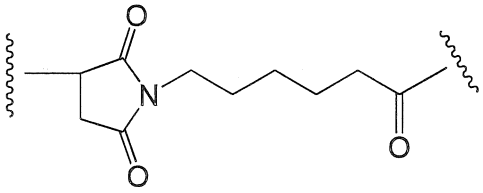


II



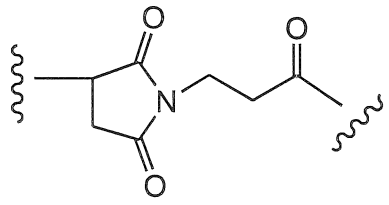
III

Đơn vị minh hoạ Stretcher có công thức II có nguồn gốc từ maleimido-caproyl (MC) trong đó R^{17} là $-(CH_2)_5-$:



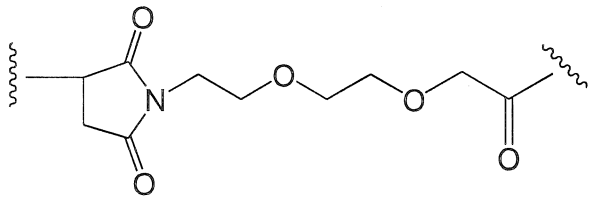
MC

Đơn vị minh hoạ Stretcher có công thức II, và là có nguồn gốc từ maleimido-propanoyl (MP) trong đó R^{17} là $-(CH_2)_2-$:

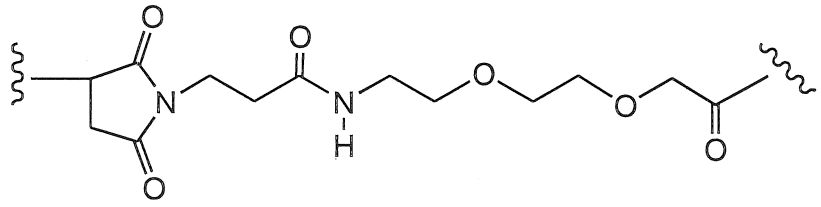


MP

Đơn vị minh hoạ Stretcher khác có công thức II trong đó R^{17} là $-(CH_2CH_2CO_r-CH_2-$ và r là 2:

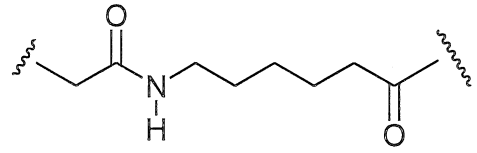


Đơn vị Stretcher minh hoạ khác có công thức II trong đó R^{17} là $-(CH2)_rC(O)NR^b(CH_2CH_2O)_r-CH2-$ trong đó R^b là H và mỗi r là 2:

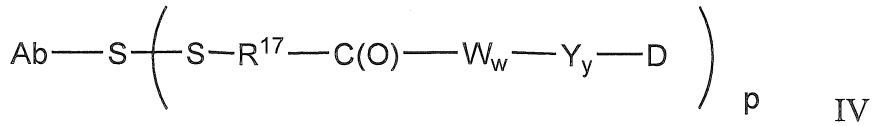


MPEG

Đơn vị Stretcher minh hoạ có công thức III trong đó R^{17} là $-(CH_2)_5-$:

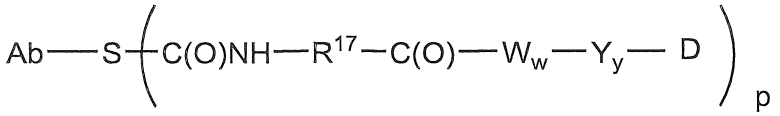


Theo phương án khác, đơn vị Stretcher được gắn kết với kháng thể kháng CD79b sinh xystein qua liên kết disulfua giữa nguyên tử lưu huỳnh xystein được sinh ra của kháng thể và nguyên tử lưu huỳnh của đơn vị Stretcher. Đơn vị Stretcher đại diện của phương án này được mô tả bởi công thức IV, trong đó R^{17}, Ab-, -W-, -Y-, -D, w và y là như được xác định trên đây.

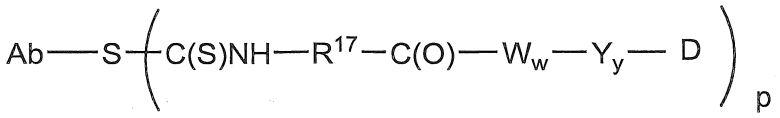


IV

Theo phương án khác nữa, nhóm phản ứng của Stretcher chứa nhóm chức phản ứng thiol mà có thể tạo thành liên kết với xystein thiol tự do của kháng thể. Các ví dụ về các nhóm chức phản ứng thiol bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, maleimit, α-haloaxetyl, các este được hoạt hoá như sucxinimit este, 4-nitrophenyl este, pentaflophenyl este, tetraflophenyl este, anhydrit, axit cloruas, sulfonyl clorua, isoxyanat và isothioxyanat. Các đơn vị Stretcher đại diện của phương án này được mô tả bởi các công thức Va và Vb, trong đó -R^{17}-, Ab-, -W-, -Y-, -D, w và y là như được xác định trên đây;



Va



Vb

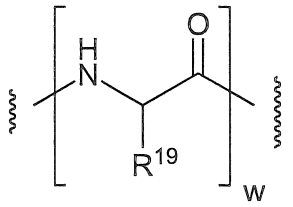
Theo phương án khác, cầu liên kết có thể là cầu liên kết kiểu hình cây để gắn kết cùng hoá trị nhiều hơn một gốc dược chất qua phần cầu liên kết nhánh, đa chức với kháng thể (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 1 1:1761-1768; King (2002) Tetrahedron Letters 43: 1987-1990). Các cầu liên kết hình cây có thể gia tăng tỷ lệ mol của dược chất với kháng thể, nghĩa là lượng, mà liên quan đến hiệu lực của ADC. Do đó, trong đó kháng thể được xử lý bởi xystein chỉ mang một nhóm xystein thiol phản ứng, vô số gốc dược chất có thể được gắn vào qua cầu liên kết hình cây.

Đơn vị axit amin

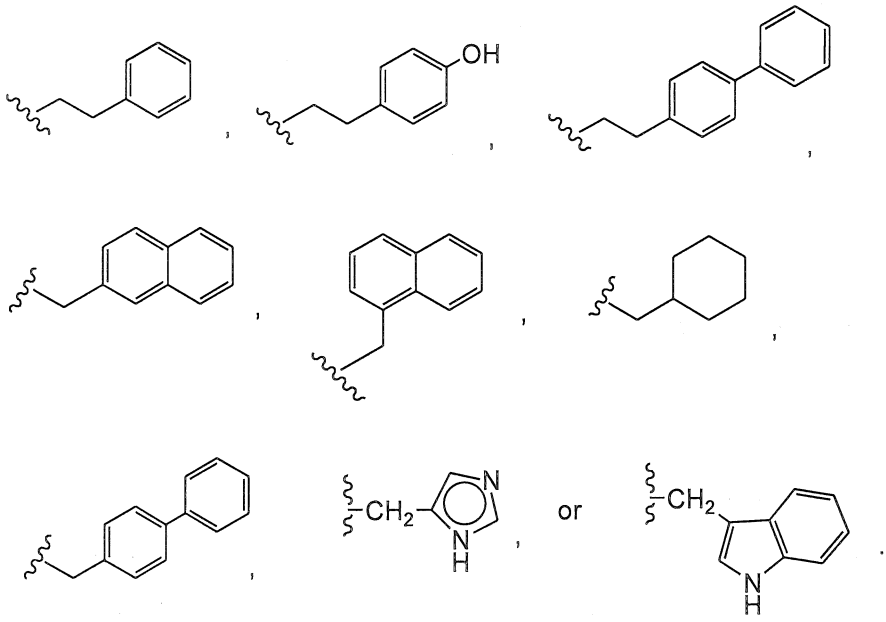
Cầu liên kết có thể bao gồm gốc axit amin. Đơn vị axit amin (-W_w-), khi có mặt, liên kết kháng thể (Ab) với phần dược chất (D) của liên hợp kháng thể được xử lý bởi xystein-dược chất (ADC) theo sáng chế.

-W_w- là đơn vị dipeptit, tripeptit, tetrapeptit, pentapeptit, hexapeptit, heptapeptit, octapeptit, nonapeptit, decapeptit, undecapeptit hoặc dodecapeptit. Gốc axit amin mà bao gồm đơn vị axit amin bao gồm các gốc xuất hiện trong tự nhiên, cũng như các axit amin tối thiểu và các axit amin không xuất hiện trong tự nhiên tương ứng, như xitrulin.

Mỗi đơn vị -W- độc lập có công thức được xác định dưới đây trong dấu ngoặc vuông và w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12:



trong đó R^{19} là hydro, metyl, isopropyl, isobutyl, sec-butyl, benzyl, p-hydroxybenzyl, $-CH_2OH$, $-CH(OH)CH_3$, $-CH_2CH_2SCH_3$, $-CH_2CONH_2$, $-CH_2COOH$, $-CH_2CH_2CONH_2$, $-CH_2CH_2COOH$, $-(CH_2)_3NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_3NH_2$, $-(CH_2)_3NHCOCH_3$, $-(CH_2)_3NHCHO$, $-(CH_2)_4NHC(=NH)NH_2$, $-(CH_2)_4NH_2$, $-(CH_2)_4NHCOCH_3$, $-(CH_2)_4NHCHO$, $-(CH_2)_3NHCONH_2$, $-(CH_2)_4NHCONH_2$, $-CH_2CH_2CH(OH)CH_2NH_2$, 2-pyridylmetyl-, 3-pyridylmetyl-, 4-pyridylmetyl-, phenyl, xyclohexyl,



Khi R^{19} là không phải hydro, nguyên tử cacbon mà R^{19} được gắn vào là đối xứng. Mỗi nguyên tử cacbon mà R^{19} được gắn vào độc lập ở dạng cấu hình (S) hoặc (R) hoặc hỗn hợp raxemic. Các đơn vị axit amin do đó có thể tinh khiết về mặt đối hình, raxemic, hoặc không đối quang.

Các đơn vị axit amin ví dụ $-W_w-$ bao gồm dipeptit, tripeptit, tetrapeptit hoặc pentapeptit. Các dipeptit ví dụ bao gồm: valin-xitrulin (vc hoặc val-cit), alanin-phenylalanin (af hoặc ala-phe). Các tripeptit ví dụ bao gồm: glyxin-valine-xitrulin

(gly-val-cit) và glyxin-glyxin-glyxin (gly-gly-gly). Gốc axit amin mà bao gồm hợp phần cầu liên kết axit amin bao gồm các hợp phần xuất hiện trong tự nhiên, cũng như các axit amin tối thiểu và các chất tương tự axit amin không xuất hiện trong tự nhiên, như xitrulin.

Đơn vị axit amin có thể được tách về mặt enzym bởi một hoặc nhiều enzym, bao gồm proteaza liên quan đến khối u, để giải phóng phần dược chất (-D), mà theo một phương án là được tạo proton in vivo ngay khi giải phóng để tạo thành dược chất (D). Các hợp phần cầu liên kết axit amin có thể được xác định và tối ưu hoá theo tính chọn lọc của chúng để phân tách enzym bằng enzym cụ thể, ví dụ, proteaza liên quan đến khối u, cathepsin B, C và D, hoặc plasmin proteaza.

Đơn vị khoảng trống

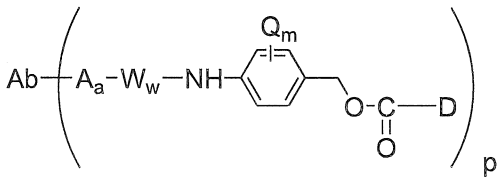
Đơn vị khoảng trống (-Yy-), khi có mặt (y = 1 hoặc 2), liên kết đơn vị axit amin (-W_w-) với phần dược chất (D) khi đơn vị axit amin có mặt (w = 1-12). Theo cách khác, đơn vị khoảng trống liên kết đơn vị Stretcher với phần dược chất khi đơn vị axit amin không có mặt. Đơn vị khoảng trống cũng liên kết phần dược chất với đơn vị kháng thể khi cả đơn vị axit amin và đơn vị khoảng trống là không có mặt (w, y = 0). Các đơn vị khoảng trống là thuộc hai loại chính: tự chết và không tự chết. Đơn vị khoảng trống không tự chết là đơn vị trong đó một phần hoặc tất cả đơn vị khoảng trống vẫn gắn kết với phần dược chất sau khi phân tách, các enzym cụ thể, của đơn vị axit amin từ thể liên hợp kháng thể-dược chất hoặc phần dược chất-cầu liên kết. Khi ADC chứa đơn vị khoảng trống glyxin-glyxin hoặc đơn vị khoảng trống glyxin trải qua phân tách enzym qua proteaza liên quan đến tế bào khối u, proteaza liên quan đến tế bào ung thư hoặc proteaza liên quan đến tế bào bạch cầu, phần glyxin-glyxin-dược chất hoặc phần glyxin-dược chất được tách khỏi Ab-A_a-Ww-. Theo một phương án, phản ứng thuỷ phân độc lập được thực hiện trong tế bào đích, tách phần glyxin-dược chất được liên kết và giải phóng dược chất.

Theo phương án khác, -Y_y- là đơn vị p-aminobenzylcarbamoyl (PAB) mà phần phenylen của nó được thế với Q_m trong đó Q là -C_1-C_6alkyl, -O-(C_1-C_6alkyl), -halogen,- nitro hoặc -xyano; và m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4.

Phương án mẫu của đơn vị khoảng trống không tự chết (-Y-) là: - Gly-Gly-; - GIy-; -Ala-Phe-; -Val-Cit-.

Theo một phương án, phần dược chất-cầu liên kết hoặc ADC được đề xuất trong đó đơn vị khoảng trống là không có mặt (y=0), hoặc muối dược dụng hoặc solvat của nó.

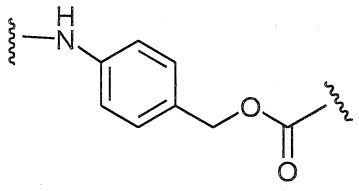
Theo cách khác, ADC chứa đơn vị khoảng trống tự chết có thể giải phóng -D. Theo một phương án, -Y- là nhóm PAB mà được liên kết với -W_w- qua nguyên tử amino nitơ của nhóm PAB và được nối trực tiếp với -D qua nhóm carbonat, carbamat hoặc ete, trong đó ADC có công thức mẫu:



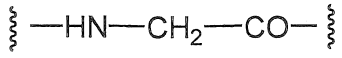
trong đó Q là –C_1-C_6 alkyl, -O-(C_1-C_6alkyl), -halogen, -nitro hoặc -xyano; m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4; và p nằm trong khoảng từ 1 đến 4.

Các ví dụ khác về các khoảng trống tự chết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các hợp chất thơm mà có ái lực điện tử tương tự với nhóm PAB như các dẫn xuất 2-aminoimidazol-5-metanol (Hay et al. (1999) Bioorg. Med. Chem. Lett. 9:2237), các chất tương đương PAB ete vòng (US 2005/0256030), beta-glucuronit (WO 2007/01 1968), và ortho hoặc para-aminobenzylaxetat. Các khoảng trống có thể được sử dụng mà trải qua sự tạo vòng ngay khi thuỷ phân liên kết amit, như các amit của axit 4-aminobutyric được thế hoặc không được thế (Rodrigues et al (1995) Chemistry Biology 2:223), các hệ vòng bixyclo[2.2.1] và bixyclo[2.2.2] được thế thích hợp (Storm et al (1972) J. Amer. Chem. Soc. 94:5815) và amit của axit 2-aminophenylpropionic (Amsberry, et al (1990) J. Org. Chem. 55:5867). Việc loại bỏ các dược chất chứa amin mà được thế ở glyxin (Kingsbury et al (1984) J. Med. Chem. 27: 1447) cũng là các ví dụ về khoảng trống tự chết hữu ích trong ADC.

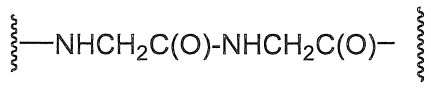
Các đơn vị khoảng trống mẫu (-Yy-) được thể hiện bởi công thức X-XII:



X



XI

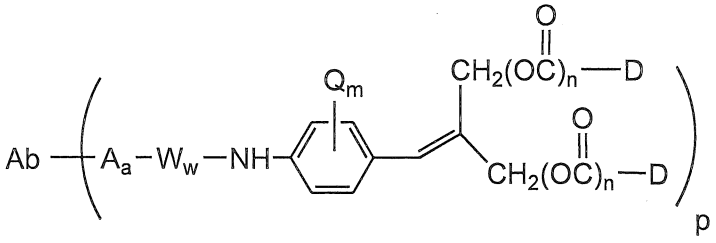


XII

Các cầu liên kết hình cây

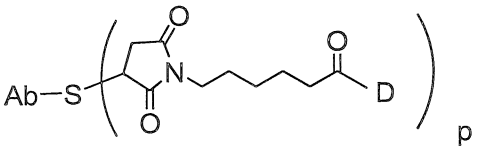
Theo phương án khác, cầu liên kết L có thể là cầu liên kết kiểu hình cây để gắn kết cùng hoá trị nhiều hơn một phần dược chất qua phần cầu liên kết nhánh, đa chức với kháng thể (Sun et al (2002) Bioorganic & Medicinal Chemistry Letters 12:2213-2215; Sun et al (2003) Bioorganic & Medicinal Chemistry 11:1761-1768). Các cầu liên kết hình cây có thể gia tăng tỷ lệ phân tử với kháng thể, nghĩa là lượng, và liên quan đến hiệu lực của ADC. Do đó, trong đó kháng thể được xử lý bởi xystein chỉ mang một nhóm xystein thiol phản ứng, rất nhiều phần dược chất có thể được gắn vào qua cầu liên kết hình cây. Các phương án mẫu của cầu liên kết nhánh, hình cây bao gồm các đơn vị 2,6-bis(hydroxymetyl)-p-cresol và 2,4,6-tris(hydroxymetyl)-phenol dendrime (WO 2004/01993; Szalai et al (2003) J. Amer. Chem. Soc. 125: 15688-15689; Shamis et al (2004) J. Amer. Chem. Soc. 126: 1726-1731; Amir et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4494-4499).

Theo một phương án, đơn vị Spacer là bis(hydroxymetyl)styren (BHMS) mạch nhánh, mà có thể được sử dụng kết hợp với và giải phóng đa dược chất, có công thức:

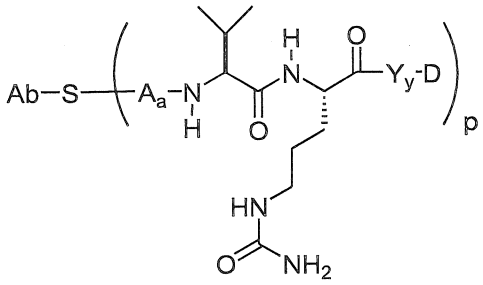


bao gồm đơn vị 2-(4-aminobenzyliden)propan-l,3-diol dendrime (WO 2004/043493; de Groot et al (2003) Angew. Chem. Int. Ed. 42:4490-4494), trong đó Q là $-C_1$-C_8alkyl, -O-(C_1-C_8alkyl), -halogen, -nitro hoặc -xyano; m là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 4; n là 0 hoặc 1; và p nằm trong khoảng từ 1 đến 4.

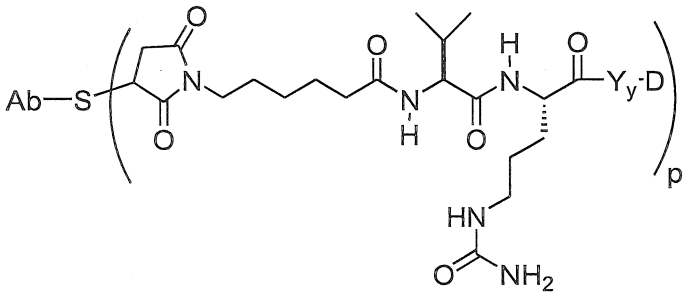
Các phương án mẫu về thể liên hợp kháng thể-dược chất có công thức I bao gồm XIIIa (MC), XIIIb (val-cit), XIIIc (MC-val-cit), và XIIId (MC-val-cit- PAB):



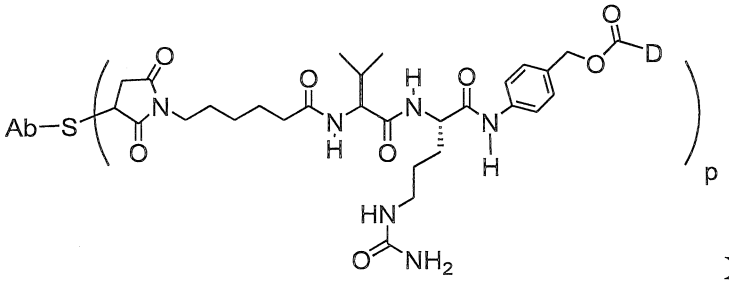
XIIIa



XIIIb



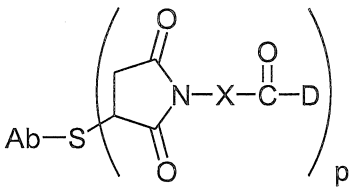
XIIIc



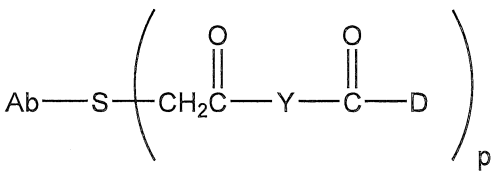
XIIId

Các phương án mẫu khác về thể liên hợp kháng thể-dược chất có công thức Ia bao gồm XIVa-e

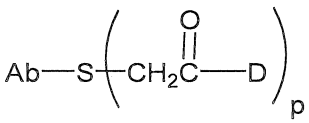
[



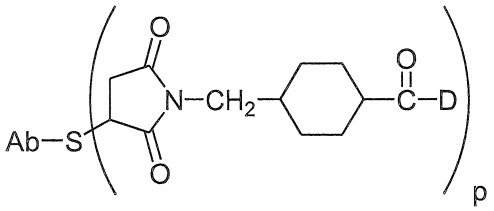
XIVa



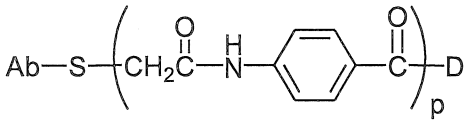
XIVb



XIVc

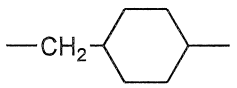
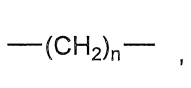
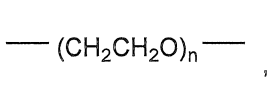


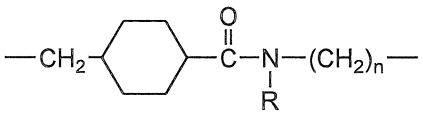
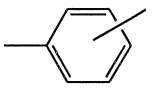
XIVd

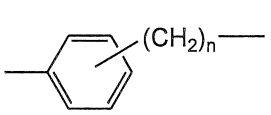
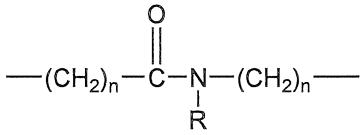


XIVe

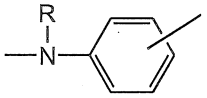
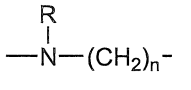
trong đó X là:


,

,

,


,

,


,
or

;

Y là:


or

;

và R độc lập là H hoặc C_1–C_6 alkyl; và n là từ 1 đến 12.

Theo phương án khác, cầu liên kết có nhóm chức phản ứng mà có nhóm ưa nhân mà là phản ứng với nhóm ái lực điện tử có mặt trên kháng thể. Các nhóm ái lực điện tử hữu ích trên kháng thể bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các nhóm aldehyt và keton carbonyl. Nguyên tử khác loại của nhóm ưa nhân của cầu liên kết có thể phản ứng với nhóm ái lực điện tử trên kháng thể và tạo thành liên kết cùng hoá trị với đơn vị kháng thể. Các nhóm ưa nhân hữu ích trên cầu liên kết bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, hydrazit, oxim, amino, hydrazin, thiosemicarbazon, hydrazin carboxylat, và arylhydrazit. Nhóm ái lực điện tử trên kháng thể tạo ra vị trí thuận lợi để gắn vào cầu liên kết.

Thông thường, các cầu liên kết kiểu peptit có thể được điều chế bằng cách tạo thành liên kết peptit giữa hai hoặc nhiều axit amin và/hoặc các mảnh peptit. Các liên kết peptit này có thể được tạo ra, ví dụ, theo phương pháp tổng hợp pha lỏng (E. Schroder and K. Lübke (1965) "The Peptit", volume 1, pp 76-136, Academic Press) mà đã biết trong lĩnh vực hoá peptit. Chất trung gian cầu liên kết có thể được kết hợp với chế phẩm bất kỳ hoặc trình tự phản ứng bao gồm các đơn vị Spacer, Stretcher, và axit amin. Các đơn vị Spacer, Stretcher, và axit amin có thể dùng các nhóm chức phản ứng mà có ái lực điện tử, ưa nhân, hoặc gốc tự do trong tự nhiên. Các nhóm chức phản ứng bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến các nhóm carboxyl, hydroxyl, para-nitrophenylcarbonat, isothioxyanat và các nhóm dời chuyển, như O-mesyl, O-tosyl, -Cl, -Br, -I; hoặc maleimit.

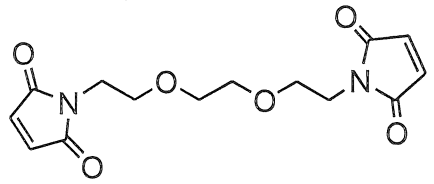
Ví dụ, hợp phần mang điện tích như sulfonat ($-SO_3^-$) hoặc amoni, có thể gia tăng khả năng hoà tan trong nước của chất phản ứng và tạo thuận lợi phản ứng cặp đôi của chất phản ứng cầu liên kết với kháng thể hoặc phần dược chất hoặc tạo thuận lợi phản ứng cặp đôi của Ab-L (chất trung gian kháng thể-cầu liên kết) với D, hoặc D-L (chất trung gian dược chất-cầu liên kết) với Ab, phụ thuộc vào đường tổôngrhợp được dùng để sản xuất ADC.

Các chất phản ứng cầu liên kết

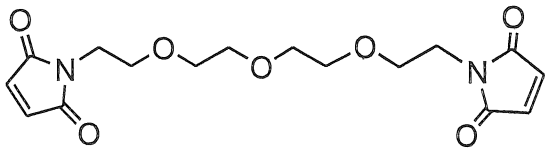
Các thể liên hợp của kháng thể và auristatin có thể được bào chế bằng cách sử dụng nhiều chất phản ứng cầu liên kết hai chức như N-sucxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), sucxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este hoạt tính (như disucxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất bis-flo hoạt tính (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen).

Các thể liên hợp kháng thể-dược chất cũng có thể được điều chế với các chất phản ứng cầu liên kết: BMPEO, BMPS, EMCS, GMBS, HBVS, LC-SMCC, MBS, MPBH, SBAP, SIA, SIAB, SMPB, SMPH, sulfo-EMCS, sulfo-GMBS, sulfo-KMUS, sulfo-MBS, sulfo-SIAB, sulfo-SMCC, và sulfo-SMPB, và SVSB (sucxinimidyl-(4-vinylsulfone)benzoat) và bao gồm các chất phản ứng bis-maleimit: DTME, BMB, BMDB, BMH, BMOE, 1,8-bis-maleimidodietyleneglycol ($BM(PEO)_2$), và 1,11-bis-

maleimidotrietyleneglycol (BM(PEO)$_3$), mà hiện có bán trên thị trường của Pierce Biotechnology, Inc., ThermoScientific, Rockford, IL, và các nhà cung cấp chất phản ứng khác. Các chất phản ứng bis-maleimit cho phép gắn kết nhóm thiol của kháng thể được xử lý bởi xystein vào phần dược chất chứa thiol, chất đánh dấu hoặc chất trung gian cầu liên kết, trong trình tự hoặc hình dạng hiện tại. Các nhóm chức khác ngoài maleimit, mà phản ứng với nhóm thiol của kháng thể được xử lý bởi xystein, phần dược chất, chất đánh dấu hoặc chất trung gian cầu liên kết bao gồm iodoaxetamit, bromoaxetamit, vinyl pyridin, disulfua, pyridyl disulfua, isoxyanat và isothioxyanat.



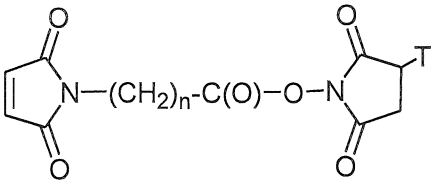
BM(PEO)$_2$



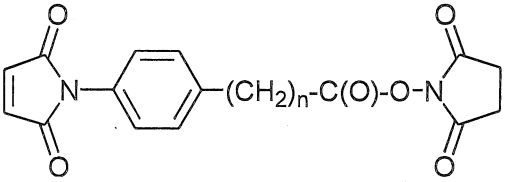
BM(PEO)$_3$

Các chất phản ứng cầu liên kết hữu ích cũng có thể thu được qua các nguồn hiện có trên thị trường khác, như Molecular Biosciences Inc.(Boulder, CO), hoặc được tổng hợp theo các quy trình được mô tả trong Toki et al (2002) J. Org. Chem. 67:1866-1872; Walker, M.A. (1995) J. Org. Chem. 60:5352-5355; Frisch et al (1996) Bioconjugate Chem. 7:180-186; US 6214345; WO 02/088172; US 2003130189; US2003096743; WO 03/026577; WO 03/043583; và WO 04/032828.

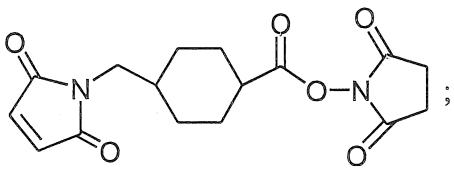
Các Stretcher có công thức (IIIa) có thể được đưa vào cầu liên kết bằng cách cho các chất phản ứng cầu liên kết sau phản ứng với tận cùng N của đơn vị axit amin:

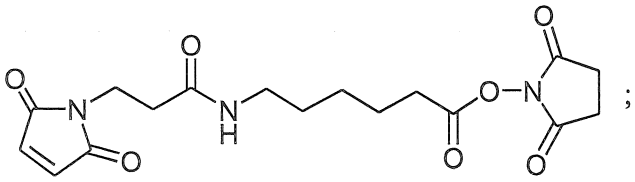


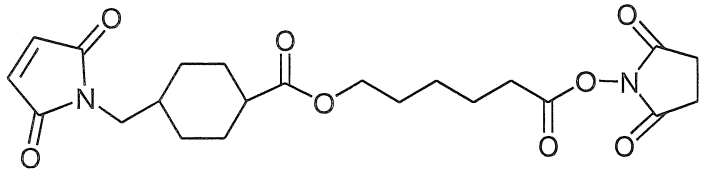
trong đó n là số nguyên nằm trong khoảng từ 1-10 và T là -H hoặc -SO_3Na;

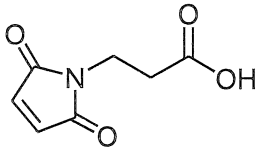


trong đó n là số nguyên nằm trong khoảng từ 0-3;

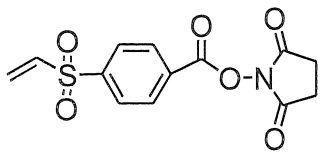
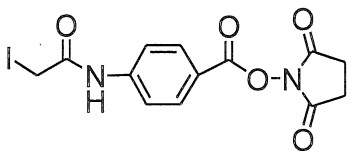
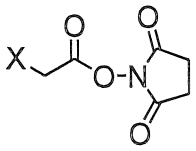
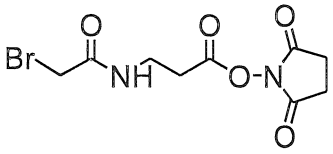
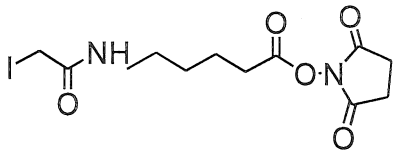

;


;


; and

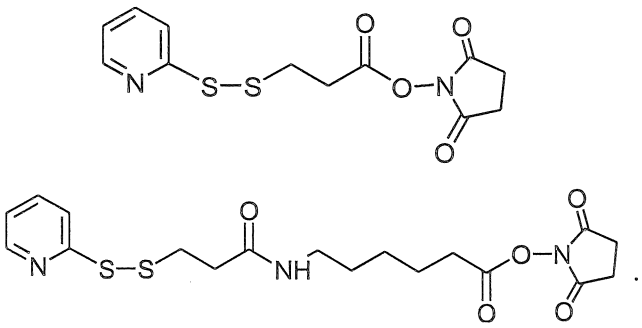

.

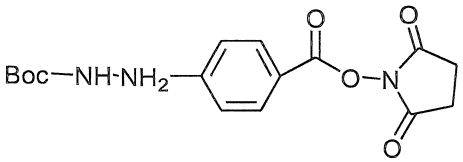
Các đơn vị Stretcher có thể được đưa vào cầu liên kết bằng cách cho các chất phản ứng hai chức sau phản ứng với tận cùng N của đơn vị axit amin:

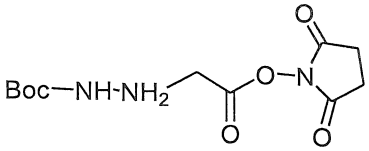






trong đó X là Br hoặc I.

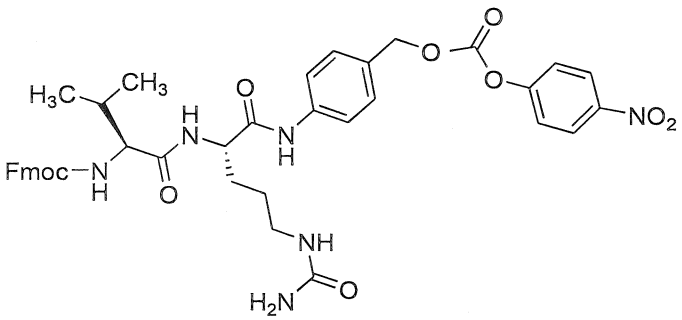
Các đơn vị Stretcher có công thức cũng có thể được đưa vào cầu liên kết bằng cách cho các chất phản ứng hai chức sau phản ứng với tận cùng N của đơn vị axit amin:



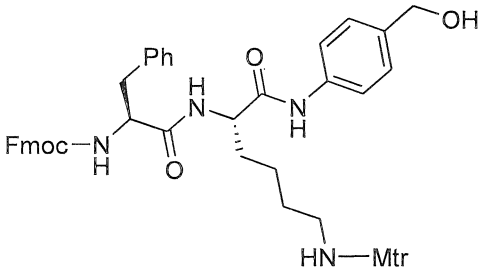




Chất phản ứng cầu liên kết valin-xitrulin (val-cit hoặc vc) dipeptit có maleimit Stretcher và para-aminobenzylcarbamoyl (PAB) Spacer tự chết có công thức:



Chất phản ứng cầu liên kết phe-lys(Mtr, mono-4-methoxytrityl) dipeptit ví dụ có đơn vị maleimit Stretcher và đơn vị PAB Spacer tự chết có thể được điều chế theo Dubowchik, et al. (1997) Tetrahedron Letters, 38:5257-60, và có công thức:



Sản xuất các thể liên hợp kháng thể-dược chất kháng CD79b sinh xystein

ADC có công thức I có thể được điều chế bằng một vài đường bằng cách dùng các phản ứng hoá hữu cơ, các điều kiện và các chất phản ứng đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, bao gồm: (1) phản ứng của nhóm ưa nhân của kháng thể với chất phản ứng cầu liên kết hoá trị hai để tạo thành chất trung gian dược chất-cầu liên kết Ab-L qua liên kết cùng hoá trị, tiếp theo bằng phản ứng với phần dược chất D; và (2) phản ứng của nhóm ưa nhân của phần dược chất với chất phản ứng cầu liên kết hoá trị hai, để tạo thành chất trung gian dược chất-cầu liên kết D-L, qua liên kết cùng hoá trị, tiếp theo bằng phản ứng với nhóm ưa nhân của kháng thể được xử lý bởi xystein. Các phương pháp liên hợp (1) và (2) có thể được dùng với nhiều kháng thể được xử lý bởi xystein, phần dược chất và cầu liên kết để tạo thành thể liên hợp kháng thể-dược chất có công thức I.

Các nhóm xystein thiol là ưa nhân và có khả năng phản ứng để tạo thành các liên kết cộng hoá trị với các nhóm ái điện tử trên các chất phản ứng cầu liên kết và các chất trung gian dược chất-cầu liên kết bao gồm: (i) các este hoạt tính như NHS este, HOBt este, haloformat và axit halogenua; (ii) alkyl và benzyl halogenua, như haloaxetamit; (iii) aldehyt, keton, carboxyl, và các nhóm maleimit; và (iv) các disulfua, bao gồm pyridyl disulfua qua trao đổi sulfua. Các nhóm ưa nhân trên phần dược chất bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến: amin, thiol, hydroxyl, hydrazit, oxim, hydrazin, thiosemicarbazon, hydrazin carboxylat và các nhóm arylhydrazit có khản năng phản ứng để tạo thành các liên kết cộng hoá trị với các nhóm ái điện tử trên các phần cầu liên kết và các chất phản ứng cầu liên kết.

Các kháng thể được xử lý bởi xystein có thể được tạo phản ứng để liên hợp với các chất phản ứng cầu liên kết bằng cách xử lý với chất khử như DTT (chất phản ứng Cleland, dithiothreitol) hoặc TCEP (tris(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA), tiếp theo bằng cách oxy hoá khử để tạo thành các liên kết disulfua trong chuỗi (Ví dụ 5). Ví dụ, toàn bộ chiều dài, các kháng thể đơn dòng sinh xystein (ThioMabs) được biểu hiện trong tế bào CHO được giảm đến khoảng 50 lần lượng dư mol của TCEP trong 3 giờ ở 37°C để khử các liên kết disulfua trong các sản phẩm cộng xystein mà có thể tạo thành giữa các gốc xystein được đưa vào mới và xystein có mặt trong môi trường nuôi cấy. ThioMab được khử được pha loãng và được nạp vào cột HiTrap S trong 10mM natri axetat, độ pH = 5, và được rửa giải với PBS chứa 0,3M natri clorua. Các liên kết

disulfua được thiết lập lại giữa các gốc xystein có mặt trong Mab ban đầu kèm pha loãng (200 nM) đồng sulfat trong nước ($CuSO_4$) ở nhiệt độ trong phòng, qua đêm. Theo cách khác, axit dehydroascorbic (DHAA) là chất oxy hoá hiệu quả để thiết lập lại các nhóm disulfua trong chuỗi của kháng thể được xử lý bởi xystein sau khi phân tách khử các sản phẩm cộng xystein. Các chất oxy hoá khác, nghĩa là chất oxy hoá và các điều kiện oxy hoá, mà đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng. Oxy hoá không khí môi trường cũng có hiệu quả. Bước oxy hoá lại trung bình, một phần tạo thành các disulfua trong chuỗi hiệu quả với độ chính xác cao và bảo quản các nhóm thiol của các gốc xystein được đưa vào mới. Lượng dư chất trung gian dược chất-cầu liên kết khoảng 10 lần, ví dụ MC-vc-PAB-MMAE, được thêm vào, trộn và để ổn định trong khoảng một giờ ở nhiệt độ trong phòng để có hiệu quả kết hợp và tạo thành thể liên hợp kháng thể-dược chất kháng CD79b. Hỗn hợp liên hợp được lọc gel và nạp vào và được rửa giải qua cột HiTrap S để loại bỏ lượng dư chất trung gian dược chất-cầu liên kết và các tạp chất khác.

Fig. 23 thể hiện quy trình chung để sản xuất kháng thể kháng xystein được biểu hiện từ môi trường nuôi cấy tế bào để liên hợp. Khi môi trường nuôi cấy tế bào chứa xystein, các sản phẩm cộng disulfua có thể tạo thành giữa axit amin xystein được đưa vào mới và xystein từ môi trường. Các sản phẩm cộng xystein này được mô tả như đường tròn trong ThioMab (bên trái) ví dụ ở Fig. 23, phải được giảm để tạo ra kháng thể được xử lý bởi xystein phản ứng để liên hợp. Các sản phẩm cộng xystein, có thể là cùng với nhiều liên kết disulfua trong chuỗi khác nhau, được tách bằng cách khử để thu được dạng được khử của kháng thể với các chất khử như TCEP. Các liên kết disulfua trong chuỗi giữa các gốc xystein được cặp đôi được tạo thành lại dưới các điều kiện oxy hoá một phần với đồng sulfat, DHAA, hoặc tiếp xúc với oxy môi trường. Các gốc xystein được đưa vào mới, được sinh ra và không được cặp đôi có khả năng phản ứng với chất phản ứng cầu liên kết hoặc các chất trung gian dược chất-cầu liên kết để tạo thành các thể liên hợp kháng thể theo sáng chế. Các ThioMab được biểu hiện ở các dòng tế bào động vật có vú dẫn đến liên hợp bên ngoài sản phẩm cộng Cys với Cys được sinh ra thông qua sự tạo thành liên kết –S-S-. Do đó, các ThioMab được tinh chế được xử lý theo quy trình khử và oxy hoá như được mô tả trong Ví dụ 5 để sản xuất ThioMab phản ứng. Các ThioMab này được sử dụng để liên hợp với các dược chất độc chứa maleimit, flophore và các chất đánh dấu khác.

10. Liposom miễn dịch

Các kháng thể kháng CD79b được mô tả ở đây cũng có thể được sản xuất như các liposom miễn dịch. "Liposom" là hạt nhỏ bao gồm các loại lipit khác nhau, phospholipit và/hoặc chất hoạt động bề mặt mà là hữu ích để phân phát dược chất cho động vật có vú. Các hợp phần liposom thường được sắp xếp ở dạng hai lớp, tương tự với sự sắp xếp lipit của các màng sinh học. Các kháng thể chứa liposom được sản xuất bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như được mô tả trong Epstein et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82:3688 (1985); Hwang et al., Proc. Natl Acad. Sci. USA 77:4030 (1980); các bằng Mỹ số 4,485,045 và 4,544,545; và WO97/38731 được công bố ngày 23/10/1997. Các liposom với thời gian lưu thông tăng cường được mô tả trong bằng Mỹ số 5,013,556.

Các liposom đặc biệt hữu ích có thể được tạo ra bằng phương pháp bay hơi pha ngược với chế phẩm lipit bao gồm phosphatidylcholin, cholesterol và PEG-phosphatidyletanolamin được tạo dẫn xuất (PEG-PE). Các liposom được đùn ra thông qua thiết bị lọc có kích thước lỗ được xác định để thu được các liposom với đường kính mong muốn. Các mảnh Fab' của kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với các liposom được mô tả trong Martin et al., J. Biol. Chem. 257:286-288 (1982) qua phản ứng trao đổi disulfua. Chất hoá trị liệu tuỳ ý được chứa trong liposom. Xem Gabizon et al., J. National Cancer Inst. 81(19):1484 (1989).

B. Một số phương pháp sản xuất kháng thể

1. Sàng lọc kháng thể kháng CD79b với các đặc tính mong muốn

Các kỹ thuật tạo ra kháng thể gắn kết với CD79b polypeptit đã được mô tả trên đây. Còn có thể chọn lọc các kháng thể với một số đặc tính sinh học, nếu muốn.

Hiệu quả ức chế sự phát triển của kháng thể kháng CD79b theo sáng chế có thể được đánh giá bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, ví dụ, bằng cách sử dụng các tế bào biểu hiện CD79b polypeptit nội sinh hoặc sau đó chuyển nhiễm với gen CD79b. Ví dụ, các dòng tế bào khối u thích hợp và các tế bào được chuyển nhiễm CD79b có thể được xử lý với kháng thể đơn dòng kháng CD79b theo sáng chế ở các nồng độ khác nhau trong vài ngày (ví dụ, 2-7) ngày và được nhuộm với tinh thế màu tím hoặc MTT hoặc được phân tích bởi một số thử nghiệm xác định màu khác. Phương pháp khác để xác định sự tăng sinh tế bào có thể bằng cách so sánh sự hấp thu

^{3}H-thymidin bởi tế bào được xử lý với sự có mặt hoặc không có mặt của kháng thể kháng CD79b theo sáng chế. Sau khi xử lý, các tế bào này được thu hoạch và lượng hoạt tính phóng xạ được kết hợp vào ADN được định lượng trong thiết bị nhấp nháy. Các đối chứng dương thích hợp bao gồm xử lý dòng tế bào được chọn lọc với kháng thể ức chế sự phát triển đã biết để ức chế sự phát triển của dòng tế bào này. Việc ức chế sự phát triển của tế bào khối u in vivo có thể được xác định theo nhiều cách đã biết trong lĩnh vực này. Tế bào khối u có thể là tế bào mà biểu hiện quá mức CD79b polypeptit. kháng thể kháng CD79b sẽ ức chế sự tăng sinh tế bào của tế bào khối u biểu hiện CD79b *in vitro* hoặc in vivo khoảng 25-100% được so với tế bào khối u không được xử lý, tốt hơn nữa là, khoảng 30-100%, và thậm chí tốt hơn nữa là khoảng 50-100% hoặc 70-100%, theo một phương án, ở nồng độ kháng thể là khoảng từ 0,5 đến 30μg/ml. Việc ức chế phát triển có thể được xác định ở nồng độ kháng thể khoảng từ 0,5 đến 30μg/ml hoặc khoảng từ 0,5nM đến 200nM trong môi trường nuôi cấy tế bào, trong đó ức chế sự phát triển được xác định 1-10 ngày sau khi tế bào khối u tiếp xúc với kháng thể. kháng thể ức chế sự phát triển in vivo nếu dùng kháng thể kháng CD79b ở khoảng từ 1μg/kg đến 100mg/kg thể trọng dẫn đến giảm cỡ khối u hoặc giảm tăng sinh tế bào khối u trong khoảng từ 5 ngày đến 3 tháng từ lần dùng kháng thể đầu tiên, tốt hơn là trong khoảng từ 5 đến 30 ngày.

Để chọn lọc đối với kháng thể kháng CD79b mà gây chết tế bào, mất tính nguyên vẹn của màng như được chỉ ra bởi, ví dụ, propidi iodua (PI), xanh trypan hoặc thu nhận 7AAD có thể được thử nghiệm liên quan đến đối chứng. Thử nghiệm thu nhận PI có thể được thực hiện với sự không có mặt của phần bổ sung và tế bào phản ứng kích thích miễn dịch. Các tế bào khối u biểu hiện CD79b polypeptit có thể được ủ với riêng môi trường hoặc môi trường chứa kháng thể kháng CD79b thích hợp (ví dụ, ở khoảng 10μg/ml). Các tế bào được ủ trong thời gian 3 ngày. Sau mỗi lần xử lý, rửa tế bào và đưa dịch lỏng vào 35mm ống nắp lọc 12 x 75 (1ml/ống, 3 ống/nhóm xử lý) để loại bỏ các khối tế bào. Sau đó, các ống nhận PI (10μg/ml). Các mẫu có thể được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị đo dòng FACSCAN® và phần mềm FACSCONVERT® CellQuest (Becton Dickinson). Các kháng thể kháng CD79b mà gây các mức chết tế báo có ý nghĩa về mặt thống kê như được xác định bằng cách hấp thu PI có thể được chọn lọc như các kháng thể kháng CD79b gây chết tế bào.

Để sàng lọc kháng thể mà gắn kết với epitop trên CD79b polypeptit được gắn kết bởi kháng thể quan tâm, thử nghiệm phong bế ngang như thử nghiệm được mô tả trong Antibodies, A Laboratory Manual, Cold Spring Harbor Laboratory, Ed Harlow and David Lane (1988), có thể được thực hiện. Thử nghiệm này có thể được sử dụng để xác định nếu kháng thể thử nghiệm gắn kết vị trí hoặc epitop giống như kháng thể kháng CD79b đã biết. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, bản đồ epitop có thể được tạo thành bằng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, trình tự kháng thể có thể được tạo đột biến bằng cách sàng lọc alanin, để nhận biết các gốc tiếp xúc. kháng thể đột biến là được thử nghiệm ban đầu để gắn kết với kháng thể đa dòng để đảm bảo việc gấp nếp đúng. Theo phương pháp khác nhau, các peptit tương ứng với các vùng khác nhau của CD79b polypeptit có thể được sử dụng trong thử nghiệm cạnh tranh với các kháng thể thử nghiệm hoặc với kháng thể thử nghiệm và kháng thể với epitop đặc trưng hoặc đã biết.

2. Một số phương pháp sàng lọc thư viện

Các kháng thể kháng CD79b theo sáng chế có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các thư viện kết hợp để sàng lọc đối với các kháng thể với hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, nhiều phương pháp là đã biết trong lĩnh vực này để tạo ra các thư viện thể hiện thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện này đối với các kháng thể có các đặc tính gắn kết mong muốn. Các phương pháp này được mô tả chung trong Hoogenboom et al. (2001) in Methods in Molecular Biology 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ), và theo một số phương án, trong Lee et al. (2004) J. Mol. Biol. 340:1073-1093.

Theo nguyên tắc, các thể đơn dòng kháng thể tổng hợp được chọn bằng các sàng lọc thư viện thể thực khuẩn chứa thể thực khuẩn mà thể hiện các mảnh kháng thể khác nhau của vùng biến đổi kháng thể (Fv) được dung hợp với protein bao ngoài thể thực khuẩn. Các thư viện thể thực khuẩn này được tạo quay bằng sắc ký ái lực đối với kháng nguyên mong muốn. Các thể đơn dòng biểu hiện các mảnh Fv có khả năng gắn kết với kháng nguyên mong muốn được hút bám vào kháng nguyên và do đó tách khỏi thể đơn dòng không gắn kết trong thư viện. Các thể đơn dòng không gắn kết sau đó được tách rửa khỏi kháng nguyên và còn có thể được làm giàu bởi chu trình hút bám kháng nguyên/tách rửa bổ sung. kháng thể kháng CD79b bất kỳ theo sáng chế có thể thu được bằng cách xác định qua chu trình sàng lọc kháng nguyên thích hợp để chọn

lọc đối với thể đơn dòng thể thực khuẩn quan tâm tiếp theo bằng cách tạo cấu trúc toàn bộ chiều dài thể đơn dòng kháng thể kháng CD79b bằng cách sử dụng các trình tự Fv từ dòng vô tính thể thực khuẩn quan tâm và trình tự vùng cố định thích hợp (Fc) được mô tả trong Kabat et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3.

Theo một số phương án, miền gắn kết kháng nguyên của kháng thể được tạo thành từ hai vùng biến đổi (V) chứa khoảng 110 axit amin, một vùng là từ chuỗi nhẹ (VL) và chuỗi nặng (VH), mà cả hai đều thể hiện ba vòng siêu biến (HVR) hoặc các vùng quyết định bổ sung (CDR). Các miền biến đổi có thể thể hiện chức năng trên thể thực khuẩn, như là các mảnh chuỗi đơn Fv (scFv), trong đó VH và VL được liên kết cùng hoá trị thông qua peptit ngắn, linh hoạt hoặc như mảnh Fab, trong đó chúng được dung hợp với miền cố định và tương tác không cùng hoá trị, như được mô tả trong Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Như được sử dụng ở đây, dòng vô tính thể thực khuẩn mã hoá scFv và mã hoá Fab đề cập chọn lọc đến "dòng vô tính thể thực khuẩn Fv" hoặc "dòng vô tính Fv."

Các kho gen VH và VL có thể được tạo đơn dòng riêng rẽ bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) và tái tổ hợp ngẫu nhiên trong thư viện thể thực khuẩn, mà sau đó có thể được tra cứu đối với thể đơn dòng gắn kết kháng nguyên như được mô tả trong Winter et al., Ann. Rev. Immunol., 12: 433-455 (1994). Các thư viện từ nguồn được tạo miễn dịch tạo ra kháng thể ái lực cao với chất sinh miễn dịch mà không cần tạo cấu trúc thể lai. Theo cách khác, kho nguyên gốc có thể được tạo đơn dòng để tạo ra nguồn đơn của kháng thể của người đến khoảng rộng không tự bản thân kháng nguyên và cả tự bản thân kháng nguyên mà khong tạo miễn dịch bất kỳ như được mô tả bởi Griffiths et al., EMBO J, 12: 725-734 (1993). Cuối cùng, các thư viện nguyên gốc cũng có thể được tạo thành về mặt tổng hợp bằng cách tạo đơn dòng các mảnh gen V không được sắp xếp từ các tế bào mầm và bằng cách sử dụng các gen mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hoá các vùng CDR3 biến đổi ở mức độ cao và để hoàn thành việc sắp xếp lại in vitro như được mô tả bởi Hoogenboom and Winter, J. MoI. Biol., 227: 381-388 (1992).

Theo một số phương án, thể thực khuẩn dạng sợi được sử dụng để thể hiện mảnh kháng thể bằng cách dung hợp với thuốc protein pIII nhỏ. Các mảnh kháng thể

có thể được thể hiện như là các mảnh Fv chuỗi đơn, trong đó các miền VH và VL được nối với chuỗi polypeptit giống nhau bằng khoảng trống polypeptit linh hoạt, ví dụ như được mô tả bởi Marks et al., J. MoI. Biol., 222: 581-597 (1991), hoặc như các mảnh Fab, trong đó một chuỗi được dung hợp với pIII và chuỗi khác được tiết vào chất bao của tế bào chủ vi khuẩn trong đó bộ cấu trúc protein bao ngoài Fab và trở thành thể hiện trên bề mặt thể thực khuẩn bằng cách đổi chỗ một số protein bao ngoài kiểu dại, ví dụ như được mô tả trong Hoogenboom et al., Nucl. Acids Res., 19: 4133-4137 (1991).

Thông thường, axit nucleic mã hoá các mảnh gen kháng thể thu được từ tế bào miễn dịch được thu hoạch từ người hoặc động vật. Nếu thư viện có xu hướng trong thể đơn dòng kháng CD79b là mong muốn, đối tượng được cho tạo miễn dịch với CD79b để sinh ra đáp ứng kháng thể và các tế bào lá lách và/hoặc tạo chu trình tế bào B khác với tế bào bạch huyết máu ngoại vi (PBL) được thu hồi để tạo cấu trúc thư viện. Theo phương án được ưu tiên, thư viện mảnh gen kháng thể của người trong thể đơn dòng kháng CD79b thu được bằng cách sinh kháng thể kháng CD79b đáp ứng ở chuột chuyển gen mang dãy gen globulin miễn dịch chức năng của người (và thiếu hệ sản xuất kháng thể nội sinh chức năng) việc tạo miễn dịch CD79b tạo ra nguồn gốc tế bào B sản xuất kháng thể của người đối với CD79b. Việc sinh ra chuột chuyển gen sản xuất kháng thể của người được mô tả dưới đây.

Việc làm giàu bổ sung đối với các quần thể tế bào phản ứng kháng CD79b có thể thu được bằng cách sử dụng quy trình sàng lọc thích hợp để phân lập các tế bào B biểu hiện kháng thể gắn kết màng đặc hiệu CD79b, ví dụ, bằng cách tách tế bào bằng cách sử dụng sắc ký ái lực CD79b hút bám tế bào với CD79b được đánh dấu flo tiếp theo bởi sắp xếp tế bào hoạt hoá dòng (FACS).

Theo cách khác, việc sử dụng các tế bào lá lách và/hoặc tế bào B hoặc các PBL khác từ tế bào cho không được tạo miễn dịch tạo ra sự thể hiện tốt hơn kho kháng thể có thể có và cũng cho phép cấu trúc thư viện kháng thể bằng cách sử dụng các loài động vật bất kỳ (người hoặc không phải người) trong đó CD79b không phải là kháng nguyên. Đối với các thư viện kết hợp cấu trúc gen kháng thể in vitro, các tế bào mầm được thu hoạch từ đối tượng để tạo ra axit nucleic mã hoá các mảnh gen kháng thể không được sắp xếp. Các tế bào miễn dịch quan tâm có thể thu được từ nhiều loài động vật, như con người, chuột đồng, chuột nhà, lagomorpha, luprine, chó, mèo, lợn, bò, ngựa và các loài chim, v.v..

Axit nucleic mã hoá các mảnh gen biến đổi của kháng thể (bao gồm các mảnh VH và VL) được thu hồi từ các tế bào quan tâm và được khuếch đại. Trong trường hợp các thư viện gen VH và VL được sắp xếp lại, ADN mong muốn có thể thu được bằng cách phân lập ADN hệ gen hoặc ARN thông tin từ các tế bào bạch cầu tiếp theo bởi phản ứng chuỗi polymeraza (PCR) với các gen mồi hợp các đầu 5' và 3' của các gen VH và VL được sắp xếp lại như được mô tả trong Orlandi et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 3833-3837 (1989), nhờ đó tạo ra các kho gen V ngược để biểu hiện. Các gen V có thể được khuếch đại từ ADN bổ trợ và ADN hệ gen, với các gen mồi sau ở đầu 5' của exon mã hoá miền V trưởng thành và các đoạn mồi sau dựa trên trong mảnh J như được mô tả trong Orlandi et al. (1989) và trong Ward et al., Nature, 341 : 544-546 (1989). Tuy nhiên, việc khuếch đại ADN bổ trợ, gen mồi sau cũng có thể dựa vào exon dẫn đầu như được mô tả trong Jones et al., Biotechnol., 9: 88-89 (1991), và các gen mồi phía trước trong vùng cố định như được mô tả trong Sastry et al., Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 86: 5728-5732 (1989). Để tối đa hoá phần bổ sung, thoái biến có thể được kết hợp vào gen mồi như được mô tả trong Orlandi et al. (1989) hoặc Sastry et al. (1989). Theo một số phương án, tính đa dạng của thư viện được làm tối đa hoá bằng cách sử dụng các gen mồi PCR được tạo đích với mỗi họ gen V để khuếch đại tất cả các dãy VH và VL hiện có mặt trong mẫu axit nucleic tế bào miễn dịch, ví dụ như được mô tả trong phương pháp của Marks et al., J. MoI. Biol., 222: 581-597 (1991) hoặc như được mô tả trong phương pháp của Orum et al., Nucleic Acids Res., 21 : 4491-4498 (1993). Để tạo đơn dòng ADN được khuếch đại vào vectơ biểu hiện, các vị trí giới hạn hiếm có thể được đưa vào gen mồi PCR như là tag ở một đầu như được mô tả trong Orlandi et al. (1989), hoặc bằng cách khuếch đại tiếp PCR với gen mồi được tạo tag như được mô tả trong Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991).

Các kho gen V được sắp xếp tổng hợp có thể nhận được từ các mảnh gen V. Hầu hết trong số chúng là mảnh gen VH của người đã được tạo đơn dòng và tạo trình tự (được báo cáo trong Tomlinson et al., J. MoI. Biol., 227: 776-798 (1992)), và được tạo bản đồ (được báo cáo trong Matsuda et al., Nature Genet., 3: 88-94 (1993); các mảnh được tạo đơn dòng này (bao gồm tất cả các hình dạng chính của vòng H1 và H2) có thể được sử dụng để sinh ra các kho gen VH ngược với các gen mồi PCR mã hoá các vòng H3 của trình tự ngược và chiều dài như được mô tả trong Hoogenboom and Winter, J. MoI. Biol., 227: 381-388 (1992). Các kho VH cũng có thể được tạo thành

với tất cả tính đa dạng trình tự được tạo đích trong vòng H3 dài của chiều dài đơn như được mô tả trong Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89: 4457-4461 (1992). Các mảnh Vk và Vλ của người đã được tạo đơn dòng và trình tự (được báo cáo trong Williams and Winter, Eur. J. Immunol., 23: 1456-1461 (1993)) và có thể được sử dụng để tạo ra các kho chuỗi nhẹ tổng hợp. Các kho gen V tổng hợp, dựa trên sự sắp xếp của các nếp gấp VH và VL và chiều dài L3 và H3, sẽ mã hoá kháng thể có tính đa dạng cấu trúc đáng kể. Tiếp theo khuếch đại gen V mã hoá các ADN, các mảnh gen V mầm có thể được sắp xếp lại in vitro theo các phương pháp của Hoogenboom and Winter, J. MoI. Biol., 227: 381-388 (1992).

Các kho mảnh kháng thể có thể được tạo cấu trúc bằng cách kết hợp các kho gen VH và VL cùng với nhau theo một vài con đường. Mỗi kho tạo ra vectơ khác nhau và vectơ tái tổ hợp in vitro, ví dụ, như được mô tả trong Hogrefe et al., Gene, 128: 1 19-126 (1993), hoặc in vivo bằng cách tiêm tổ hợp, ví dụ, hệ loxP được mô tả trong Waterhouse et al., Nucl. Acids Res., 21 : 2265-2266 (1993). Phương pháp tái tổ hợp in vivo khai thác hai mảnh Fab của chuỗi tự nhiên để khắc phục giới hạn trên cỡ thư viện được chấp nhận bởi sự biến nạp hiệu quả E. coli. Các kho VH và VL nguyên gốc được tạo đơn dòng riêng rẽ, vào thể thực khuẩn và một vào vectơ thể thực khuẩn. Hai thư viện sau đó được kết hợp bởi tiêm thể thể thực khuẩn vi khuẩn chứa thể thực khuẩn sao cho mỗi tế bào chứa tổ hợp khác nhau và cỡ thư viện là chỉ bị giới hạn bởi số lượng tế bào có mặt (khoảng 10^{12} đơn dòng). Cả hai vectơ chứa tín hiệu tái tổ hợp in vivo sao cho các gen VH và VL được tái tổ hợp lên sự sao chép đơn và cùng đóng gói vào vectơ thể thực khuẩn. Các thư viện lớn này tạo ra số lượng lớn kháng thể ngược có ái lực tốt (K_d^{-1} là khoảng 10^{-8}M).

Theo cách khác, các thư viện này có thể được tạo đơn dòng sau đó vào vectơ giống nhau, ví dụ như được mô tả trong Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88: 7978-7982 (1991), hoặc được kết hợp với nhau bởi PCR và sau đó được tạo đơn dòng, ví dụ như được mô tả trong Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Bộ PCR cũng có thể được sử dụng để kết hợp các ADN VH và VL với ADN mã hoá khoảng trống peptit linh hoạt để tạo thành thư viện chuỗi đơn Fv (scFv). Theo kỹ thuật khác nữa, "bộ tế bào PCR" được sử dụng để kết hợp các gen VH và VL trong tế bào bạch huyết bởi PCR và sau đó các thư viện đơn dòng của gen được liên kết như được mô tả trong Embleton et al., Nucl. Acids Res., 20: 3831-3837 (1992).

Các kháng thể được sinh ra bởi thư viện nguyên gốc (tự nhiên hoặc tổng hợp) có thể điều biến ái lực (Kd^{-1} là khoảng từ 10^6 đến 10^7 M^{-1}), nhưng đột biến ái lực cũng có thể được mô phỏng in vitro bằng cách tạo cấu trúc và chọn lọc lại từ các thư viện thứ cấp như được mô tả trong Winter et al. (1994), nêu trên. Ví dụ, đột biến có thể được đưa vào ngẫu nhiên in vitro bằng cách sử dụng sai số dễ sảy ra polymeraza (được báo cáo trong Leung et al., Technique, 1 : 1 1-15 (1989)) trong phương pháp của Hawkins et al., J. MoI. Biol., 226: 889-896 (1992) hoặc trong phương pháp của Gram et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 89: 3576-3580 (1992). Ngoài ra, đột biến ái lực có thể được thực hiện bằng cách tạo đột biến ngẫu nhiên một hoặc nhiều CDR, ví dụ bằng cách sử dụng PCR với gen mồi mang trình tự ngẫu nhiên tạo quay CDR quan tâm, trong thể đơn dòng Fv riêng rẽ chọn lọc và sàng lọc đơn dòng ái lực cao. WO 9607754 (được công bố ngày 14/3/1996) mô tả phương pháp gây đột biến gen trong vùng quyết định bổ sung của chuỗi nhẹ globulin miễn dịch để sinh ra thư viện gen chuỗi nhẹ. Phương pháp hiệu quả khác là tổ hợp các miền VH hoặc VL được chọn lọc bằng cách thể hiện thể thực khuẩn với các kho biến thể miền V xuất hiện trong tự nhiên thu được từ tế bào cho không được tạo miễn dịch và sàng lọc đối với ái lực cao trong vài đường tròn của chuỗi cải tổ lại như được mô tả trong Marks et al., Biotechnol., 10: 779-783 (1992). Kỹ thuật này cho phép sản xuất kháng thể và mảnh kháng thể với ái lực là khoảng 10^{-9}M hoặc nhỏ hơn.

Việc sàng lọc các thư viện có thể được kết thúc bằng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực này. Ví dụ, CD79b có thể được sử dụng để bao ngoài các giếng của các đĩa hút bám, được biểu hiện trên các tế bào chủ được gắn vào các đĩa hút bám hoặc được sử dụng trong sắp xếp tế bào hoặc được liên hợp với biotin để bắt với các hạt được bao ngoài streptavidin hoặc được sử dụng trong các phương pháp khác nhau để quay thư viện thể hiện thể thực khuẩn.

Các mẫu thư viện thể thực khuẩn có liên quan đến CD79b được làm cố định dưới các điều kiện thích hợp để gắn kết ít nhất là một phần hạt thể thực khuẩn kèm hút bám. Thông thường, các điều kiện, bao gồm độ pH, cường độ ion, nhiệt độ và tương tự được chọn lọc đối với các điều kiện sinh lý mô phỏng. Các thể thực khuẩn được gắn kết với pha rắn được rửa và sau đó được tách rửa bằng axit, ví dụ như được mô tả trong Barbas et al., Proc. Natl. Acad. Sci USA, 88: 7978-7982 (1991), hoặc bằng kiềm, ví dụ như được mô tả trong Marks et al., J. MoI. Biol., 222: 581-597 (1991), hoặc bằng

cạnh tranh kháng nguyên CD79b, ví dụ trong quy trình tương tự với phương pháp cạnh tranh kháng nguyên của Clackson et al., Nature, 352: 624-628 (1991). Các thể thực khuẩn có thể được làm giàu 20-1.000 lần trong vòng chọn lọc đơn. Hơn nữa, thể thực khuẩn được làm giàu có thể được phát triển trong nuôi cấy tế bào và được cho vào các vòng chọn lọc tiếp.

Hiệu quả chọn lọc phụ thuộc vào nhiều yếu tố, bao gồm động học phân ly trong khi rửa và nhiều mảnh kháng thể trên thể thực khuẩn đơn có thể sắp xếp đồng thời với kháng nguyên. Các kháng thể với động học phân ly nhanh (và ái lực gắn kết yếu) có thể được giữ lại bằng cách sử dụng rửa ngắn, thể hiện thể thực khuẩn đa hoá trị và mật độ bao ngoài kháng nguyên trong pha rắn cao. Mật độ cao không chỉ làm ổn định thể thực khuẩn thông qua tương tác đa hoá trị, nhưng gắn kết lại thể thực khuẩn mà đã được phân ly. Việc chọn lọc kháng thể với động học phân ly thấp (và ái lực gắn kết tốt) có thể được cải thiện bằng cách sử dụng rửa lâu và thể hiện thể thực khuẩn hoá trị một như được mô tả trong Bass et al., Proteins, 8: 309-314 (1990) và trong WO 92/09690, và mật độ bao ngoài thấp của kháng nguyên như được mô tả trong Marks et al., Biotechnol, 10: 779-783 (1992).

Có thể chọn lọc giữa các kháng thể thể thực khuẩn có các ái lực khác nhau, thậm chí với ái lực mà khác nhau không đáng kể, đối với CD79b. Tuy nhiên, đột biến ngẫu nhiên của kháng thể chọn lọc (ví dụ như được thực hiện trong một số kỹ thuật đột biến ái lực) là tương tự để thu được phát sinh nhiều đột biến, hầu hết gắn kết với kháng nguyên, và ít ái lực cao hơn. Với CD79b giới hạn, hiếm có thể thực khuẩn ái lực cao có thể được cạnh tranh. Để duy trì tất cả đột biến ái lực cao hơn, các thể thực khuẩn có thể được ủ với lượng dư CD79b được biotyl hoá, nhưng với CD79b được biotyl hoá ở nồng độ phân tử thấp hơn hằng số ái lực phân tử đích đối với CD79b. Thể thực khuẩn gắn kết ái lực cao sau đó có thể được bắt bởi các hạt thuận từ bao ngoài streptavidin. "Bắt cân bằng" cho phép kháng thể sẽ được chọn theo ái lực gắn kết của chúng, với độ nhạy mà cho phép phân lập các dòng vô tính đột biến với ít ái lực cao gấp hai lần từ lượng dư lớn thể thực khuẩn với ái lực thấp hơn. Các điều kiện được sử dụng trong việc rửa thể thực khuẩn được gắn kết với thể thực khuẩn rắn cũng có thể được thao tác để phân biệt dựa trên động học phân ly.

Các dòng vô tính kháng CD79b có thể được chọn lọc dựa trên hoạt tính. Theo một số phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b mà gắn kết với tế bào sống mà biểu hiện tự nhiên CD79b. Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD79b mà phong bế gắn kết giữa phối tử CD79b và CD79b, nhưng không phong bế gắn kết giữa phối tử CD79b và protein thứ hai. Các dòng vô tính Fv tương ứng với kháng thể kháng CD79b có thể được chọn lọc bởi (1) phân lập thể đơn dòng kháng CD79b từ thư viện thể thực khuẩn như được mô tả trên đây, và tuỳ ý khuếch đại quần thể thể đơn dòng thể thực khuẩn được phân lập bằng cách phát triển quần thể này trong vật chủ vi khuẩn thích hợp; (2) chọn lọc CD79b và protein thứ hai đối với mà phong bế hoặc không phong bế hoạt tính, tương ứng, là mong muốn; (3) hút bám thể đơn dòng thể thực khuẩn kháng CD79b vào CD79b được làm ổn định; (4) bằng cách sử dụng lượng dư protein thứ hai để tách rửa các thể đơn dòng không mong muốn bất kỳ mà nhận biết các quyết định gắn kết CD79b mà gối lên hoặc góp phần với các quyết định gắn kết của protein thứ hai; và (5) tách rửa các thể đơn dòng mà vẫn còn bước hút bám sau đây (4). Tuỳ ý, các thể đơn dòng với các đặc tính phong bế/không phong bế mong muốn còn có thể được làm giàu bằng cách lặp lại các quy trình được mô tả ở đây một hoặc nhiều lần.

ADN mã hoá thể lai có nguồn gốc từ kháng thể đơn dòng hoặc thể thực khuẩn thể hiện các dòng vô tính Fv theo sáng chế là được phân lập một cách dễ dàng và tạo trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ bằng cách sử dụng các đoạn mồi oligonucleotit được dự định khuếch đại đặc hiệu các vũng mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ quan tâm từ thể lai và mẫu ADN thể thực khuẩn). Khi được phân lập, ADN có thể được định vị vào vectơ biểu hiện, mà sau đó được biến nạp vào các tế bào chủ như các tế bào E. coli, các tế bào COS của khỉ, các tế bào buồng trứng của chuột đồng Trung quốc (CHO), hoặc các tế bào myelin mà không sản xuất protein globulin miễn dịch khác, để thu được việc tổng hợp các kháng thể đơn dòng mong muốn trong các tế bào chủ tái tổ hợp. Các điều xem xét trên sự biểu hiện tái tổ hợp ở vi khuẩn của ADN mã hoá kháng thể bao gồm Skerra et al., Curr. Opinion in Immunol., 5: 256 (1993) và Pluckthun, Immunol. Revs, 130: 151 (1992).

ADN mã hoá thể đơn dòng Fv theo sáng chế có thể kết hợp với trình tự ADN đã biết mã hoá các vùgn cố định chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ (ví dụ trình tự ADN thích hợp có thể thu được từ Kabat et al., nêu trên) để tạo thành thể đơn dòng mã hoá

toàn bộ hoặc một phần chiều dài chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ. Sẽ thích hợp rằng các vùng cố định của isotyp bất kỳ có thể được sử dụng cho mục đích này, bao gồm các vùng cố định IgG, IgM, IgA, IgD, và IgE và các vùng cố định này có thể thu được từ người hoặc loài động vật bất kỳ. Thể đơn dòng Fv có nguồn gốc từ ADN miền biến đổi của một loài động vật (như người) và sau đó được dung hợp với ADN vùng cố định của các loài động vật khác để tạo thành (các) trình tự mã hoá đối với toàn bộ chiều dài chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ "lai" được bao gồm trong định nghĩa về kháng thể "khảm" và "lai" như được sử dụng ở đây. Theo một số phương án, thể đơn dòng Fv có nguồn gốc từ ADN biến đổi của người được dung hợp với ADN vùng cố định của người để tạo thành (các) trình tự mã hoá đối với toàn bộ chiều dài hoặc một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ của người.

ADN mã hoá kháng thể kháng CD79b có nguồn gốc từ thể lai theo sáng chế cũng có thể được cải biến, ví dụ, bằng cách thay thế trình tự mã hoá đối với các miền cố định chuỗi nặng và nhẹ thay thể có trình tự tương đồng của chuột có nguồn gốc từ thể đơn dòng lai (ví dụ như trong phương pháp của Morrison et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81 : 6851-6855 (1984)). ADN mã hoá thể đơn dòng lai hoặc Fv có nguồn gốc từ kháng thể hoặc mảnh còn có thể được cải biến tiếp bằng cách kết hợp cùng hoá trị với globulin miễn dịch mã hoá tất cả trình tự hoặc một phần của trình tự mã hoá đối với polypeptit protein không miễn dịch. Trong phương pháp này, các kháng thể "khảm" hoặc "lai" được điều chế mà có tính đặc hiệu gắn kết của thể đơn dòng Fv hoặc thể lai có nguồn gốc từ kháng thể theo sáng chế.

C. Điều trị tiền dược chất qua trung gian enzym phụ thuộc kháng thể (ADEPT)

Kháng thể theo sáng chế cũng có thể được sử dụng trong ADEPT bằng cách liên hợp kháng thể với enzym hoạt hoá tiền dược chất mà chuyển hoá tiền dược chất (ví dụ, chất hoá trị liệu peptidyl, xem WO81/01145) để hoạt hoá dược chất chống ung thư. Xem, ví dụ, WO 88/07378 và bằng Mỹ số 4,975,278.

Hợp phần enzym của liên hợp miễn dịch hữu ích đối với ADEPT bao gồm enyzm có khả năng hoạt hoá trên tiền dược chất theo cách để chuyển hoá nó thành dạng hoạt hoá, độc tố hơn.

Các enzym mà là hữu ích trong phương pháp theo sáng chế bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, phosphataza kiềm hữu ích để chuyển hoá tiền dược chất chứa phosphat thành dược chất tự do; arylsulfataza hữu ích để chuyển hoá các tiền dược

chất chứa sulfat thành các dược chất tự do; xytosin deaminaza hữu ích để chuyển hoá 5-floxytosin không độc tố thành dược chất chống ung thư, 5-flouraxil; proteaza như seratia proteaza, thermolysin, subtilisin, carboxypeptidaza và cathepsin (như cathepsin B và L), là hữu ích để chuyển hoá các tiền dược chất chứa peptit thành dược chất tự do; D-alanylcarboxypeptidaza, hữu ích để chuyển hoá tiền dược chất mà chứa các thay thế axit amin D; các enzym phân tách carbohydrat như β-galactosidaza và neuraminidaza hữu ích để chuyển hoá các tiền dược chất được glycosyl hoá thành dược chất tự do; β-lactamaza hữu ích để chuyển hoá dược chất được tạo dẫn xuất với β-lactam thành dược chất tự do; và penixilin amidaza, như penixilin V amidaza hoặc penixilin G amidaza, hữu ích để chuyển hoá dược chất được tạo dẫn xuất ở các amin nitơ của chúng với các nhóm phenoxyaxetyl hoặc phenylaxetyl, tương ứng, thành dược chất tự do. Theo cách khác, kháng thể với hoạt tính enzym, cũng đã biết trong lĩnh vực này như "abzym", có thể được sử dụng để chuyển hoá tiền dược chất theo sáng chế thành dược chất hoạt tính tự do (xem, ví dụ, Massey, Nature 328:457-458 (1987)). Các thể liên hợp kháng thể-abzym có thể được sản xuất như được mô tả ở đây để phân phát abzym đến quần thể tế bào khối u.

Các enzym theo sáng chế có thể được gắn kết cộng hoá trị với kháng thể kháng CD79b bằng các kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này như sử dụng các chất phản ứng liên kết ngang hai chức khác nhau được mô tả trên đây. Theo cách khác, các protein dung hợp bao gồm ít nhất là một vùng gắn kết kháng nguyên của kháng thể theo sáng chế liên kết với ít nhất là một phần hoạt tính chức năng của enzym theo sáng chế có thể được tạo cấu trúc bằng cách sử dụng các kỹ thuật ADN tái tổ hợp đã biết trong lĩnh vực này (xem, ví dụ, Neuberger et al., Nature 312:604-608 (1984).

D. kháng thể kháng CD79b

Ngoài kháng thể kháng CD79b được mô tả ở đây, được đề xuất rằng các biến thể kháng thể kháng CD79b có thể được tạo ra. Các biến thể kháng thể kháng CD79b có thể được tạo ra bằng cách đưa các thay đổi nucleotit thích hợp vào ADN mã hoá và/hoặc bằng cách tổng hợp kháng thể hoặc polypeptit mong muốn. Chuyên gia trong lĩnh vực này sẽ cảm kích rằng các thay đổi axit amin có thể làm thay đổi các xử lý sau dịch mã của kháng thể kháng CD79b, như thay đổi số lượng hoặc vị trí glycosyl hoá hoặc thay đổi các đặc tính gắn kết màng.

Các biến thể trong kháng thể kháng CD79b được mô tả ở đây, có thể được tạo ra, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật và hướng dẫn bất kỳ đối với các đột biến bảo tồn và không bảo tồn đã được nêu, ví dụ, trong bằng Mỹ số 5,364,934. Các biến thể có thể là thay thế, loại bỏ hoặc lồng một hoặc nhiều mã bộ ba mã hoá kháng thể hoặc polypeptit mà dẫn đến thay đổi trình tự axit amin như được so với kháng thể trình tự nguyên gốc hoặc polypeptit. Tuỳ ý, biến thể là bằng cách thay thế ít nhất là một axit amin với axit amin bất kỳ khác ở một hoặc nhiều miền của kháng thể kháng CD79b. Hướng dẫn xác định gốc axit amin có thể là lồng, thay thế hoặc loại bỏ mà không có tác dụng ngược hoạt tính mong muốn có thể được phát hiện bằng cách so sánh trình tự của kháng thể kháng CD79b với trình tự của phân tử protein đã biết tương đồng và làm giảm thiểu số lượng thay đổi trình tự axit amin trong vùng có tính tương đồng cao. Các thay thế axit amin có thể là kết quả của thay thế một axit amin với axit amin khác có cấu trúc và/hoặc đặc tính hoá học tương tự, như thay thế leuxin với serin, nghĩa là, thay thế axit amin bảo tồn. Việc lồng hoặc loại bỏ có thể tuỳ ý nằm trong khoảng từ 1 đến 15 axit amin. Biến thể được cho phép có thể được xác định bằng cách tạo hệ thống lồng, loại bỏ hoặc thay thế axit amin trong trình tự và thử nghiệm các biến thể thu được đối với hoạt tính được thể hiện bởi toàn bộ chiều dài hoặc trình tự nguyên gốc trưởng thành.

Các mảnh kháng thể kháng CD79b được đề xuất ở đây. Các mảnh này có thể được cắt ở tận cùng N hoặc tận cùng C hoặc có thể thiếu gốc nội tại, ví dụ, khi được so với toàn bộ chiều dài kháng thể nguyên gốc hoặc protein. Một số mảnh thiếu các gốc axit amin mà không cần thiết đối với hoạt tính sinh học của kháng thể kháng CD79b.

Các mảnh kháng thể kháng CD79b có thể được tạo ra bởi nhiều kỹ thuật thông thường bất kỳ. Các mảnh peptit mong muốn có thể được tổng hợp hoá học. Phương pháp khác bao gồm tạo ra kháng thể hoặc mảnh polypeptit bằng cách tiêu hoá enzym, ví dụ, bằng cách xử lý protein với enzym đã biết để tách protein ở các vị trí được xác định bởi các gốc axit amin cụ thể hoặc bằng cách tiêu hoá ADN với các enzym giới hạn thích hợp và phân lập mảnh mong muốn. Các kỹ thuật thích hợp khác nữa bao gồm phân lập và khuếch đại mảnh ADN mã hoá kháng thể hoặc mảnh polypeptit mong muốn, bằng phản ứng chuỗi polymeraza (PCR). Các oligonucleotit mà xác định tận cùng mong muốn của mảnh ADN được dùng ở các gen mồi 5' và 3' trong PCR. Tốt

hơn là, các mảnh kháng thể kháng CD79b góp phần ít nhất là một hoạt tính sinh học và/hoặc miễn dịch với kháng thể nguyên gốc kháng CD79b được mô tả ở đây.

Theo phương án cụ thể, các thay thế bảo tồn quan tâm được thể hiện trong Bảng 8 dưới tiêu đề là các thay thế được ưu tiên. Nếu các thay thế này dẫn đến thay đổi hoạt tính sinh học, sau đó nhiều thay đổi tiếp theo, được gọi là các thay thế ví dụ trong Bảng 8 hoặc như được mô tả tiếp dưới đây tham khảo đến các lớp axit amin, được đưa vào và sản phẩm được sàng lọc.

Bảng 8

Gốc ban đầu	Các thay thế ví dụ	Các thay thế được ưu tiên
Ala (A)	val; leu; ile	val
Arg (R)	lys; gln; asn	lys
Asn (N)	gln; his; lys; arg	gln
Asp (D)	glu	glu
Cys (C)	ser	ser
Gln (Q)	asn	asn
Glu (E)	asp	asp
Gly (G)	pro; ala	ala
His (H)	asn; gln; lys; arg	arg
Ile (I)	leu; val; met; ala; phe; norleucine	leu
Leu (L)	norleucine; ile; val; met; ala; phe	ile
Lys (K)	arg; gln; asn	arg
Met (M)	leu; phe; ile	leu
Phe (F)	leu; val; ile; ala; tyr	leu
Pro (P)	ala	ala
Ser (S)	thr	thr
Thr (T)	ser	ser
Trp (W)	tyr; phe	tyr
Tyr (Y)	trp; phe; thr; ser	phe
Val (V)	ile; leu; met; phe; ala; norleucine	leu

Các cải biến về căn bản là chức năng hoặc xác định tính miễn dịch của kháng thể kháng CD79b được kết thúc bằng cách chọn lọc các thay thế mà khác nhau đáng kể về hiệu quả của chúng để duy trì (a) cấu trúc của khung polypeptit ở diện tích thay thế, ví dụ, như dạng tấm hoặc xoắn, (b) mang điện hoặc tính kỵ nước của phân tử ở vị

trí đích hoặc (c) khối chuỗi phụ. Các gốc xuất hiện tự nhiên được phân chia thành các nhóm dựa trên các đặc tính chuỗi phụ thông thường:

(1) Kỵ nước: norleucine, met, ala, val, leu, ile;

(2) ưa nước trung tính: cys, ser, thr;

(3) axit: asp, glu;

(4) bazơ: asn, gln, his, lys, arg;

(5) các gốc mà tác động đến hướng của chuỗi: gly, pro; và

(6) thơm: trp, tyr, phe.

Các thay thế không bảo tồn sẽ gây ra trao đổi thành viên của một trong số các lớp này đối với lớp khác. Các gốc thay thế này cũng có thể được đưa vào các vị trí thay thế bảo tồn hoặc, vào các vị trí còn lại (không được bảo tồn).

Các biến thể này có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này như đột biến gen qua trung gian oligonucleotit (định hướng vị trí), quét alanin và đột biến gen PCR. Các đột biến gen định hướng vị trí [Carter *et al.*, Nucl. Acids Res., 13:4331 (1986); Zoller *et al.*, Nucl. Acids Res., 10:6487 (1987)], đột biến gen cát xét (Wells *et al.*, Gene, 34:315 [1985]), đột biến chọn lọc giới hạn (Wells *et al.*, Philos. Trans. R. Soc. London SerA, 317:415 [1986]) hoặc các kỹ thuật khác đã biết có thể được thực hiện trên ADN được tạo đơn dòng để tạo ra biến thể CD79b ADN.

Phân tích quét axit amin cũng có thể được dùng để nhận biết một hoặc nhiều axit amin cùng với trình tự liền kề. Trong số các axit amin quét được ưu tiên là axit amin tương đối nhỏ, trung tính. Các axit amin này bao gồm alanin, glyxin, serin, và xystein. Alanin thường là axit amin quét được ưu tiên cùng với nhóm này bởi vì nó loại bỏ chuỗi phụ ngay beta-cacbon và là tương tự ít hơn để thay đổi cấu hình chuỗi chính của biến thể (Cunningham and Wells, Science, 244: 1081-1085 [1989]). Alanin cũng thường được ưu tiên bởi vì nó là axit amin phổ biến nhất. Hơn nữa, nó được phát hiện trong cả vị trí bị che lấp và được phơi bày (Creighton, The Proteins, (W.H. Freeman & Co., N.Y.); Chothia, J. Mol. Biol., 150:1 [1976]). Nếu thay thế alanin không đạt được lượng tương ứng của biến thể, axit amin isoteric có thể được sử dụng.

Gốc xystein bất kỳ không liên quan đến việc duy trì hình dạng đúng của kháng thể kháng CD79b cũng có thể được thế, thường là với serin, để cải thiện tính ổn định oxy hoá của phân tử và ngăn ngừa liên kết ngang khác thường. Ngược lại, (các) liên

kết xystein có thể được bổ sung vào kháng thể kháng CD79b để cải thiện tính ổn định của nó (cụ thể là trong đó kháng thể là mảnh kháng thể như mảnh Fv).

Kiểu biến thể thay thế đặc biệt được ưu tiên bao gồm thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể ban đầu (ví dụ, kháng thể được làm thích hợp với người hoặc của người). Thông thường, (các) biến thể thu được được chọn để phát triển tiếp sẽ được cải hiện các đặc tính sinh học liên quan đến kháng thể ban đầu từ đó mà chúng được sinh ra. Cách thông thường để tạo ra các biến thể thay thế này bao gồm sự trưởng thành ái lực bằng cách sử dụng thể hiện thể thực khuẩn. Một cách vắn tắt, một vài vị trí vùng siêu biến (ví dụ, 6-7 vị trí) được tạo đột biến để sinh ra tất cả thay thế axit amin có thể có ở mỗi vị trí. Các biến thể kháng thể do đó được sinh ra được thể hiện ở dạng hoá trị một từ các hạt thể thực khuẩn dạng sợi như dung hợp với sản phẩm gen III của M13 được đóng gói trong mỗi hạt. Các biến thể thể hiện thể thực khuẩn sau đó được sàng đối với hoạt tính sinh học của chúng (ví dụ, ái lực gắn kết) như được mô tả ở đây. Để nhận biết các vị trí vùng siêu biến quan tâm để cải biến, các đột biến gen sàng alanin có thể được thực hiện để nhận biết các gốc vùng siêu biến góp phần đáng kể vào gắn kết kháng nguyên. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, có thể có lợi để phân tích cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để nhận biết các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và CD79b polypeptit. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận là quan tâm để thay thế theo các kỹ thuật được mô tả ở đây. Khi các biến thể này được tạo ra, tấm biến thể được cho vào sàng như được mô tả ở đây và các kháng thể với các đặc tính quan trọng theo một hoặc nhiều thử nghiệm liên quan có thể được chọn để phát triển tiếp.

Các phân tử axit nucleic mã hoá các biến thể trình tự axit amin của kháng thể kháng CD79b được tạo ra bằng nhiều phương pháp đã biết trong lĩnh vực này. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, phân lập từ nguồn tự nhiên (trong trường hợp về các biến thể trình tự axit amin xuất hiện tự nhiên) hoặc tạo ra bằng cách đột biến gen qua trung gian oligonucleotit (hoặc định hướng vị trí), đột biến PCR và đột biến cát xét của biến thể được tạo ra sớm hơn hoặc phiên bản không biến thể của kháng thể kháng CD79b.

E. Các cải biến kháng thể kháng CD79b

Các cải biến cộng hóa trị của kháng thể kháng CD79b được bao gồm trong phạm vi của sáng chế. Một kiểu cải biến cộng hóa trị bao gồm cho các gốc axit amin

đích của kháng thể kháng CD79b phản ứng với chất tạo dẫn xuất hữu cơ mà có khả năng phản ứng với các chuỗi phụ chọn lọc hoặc các gốc tận cùng N– hoặc C- của kháng thể kháng CD79b. Việc tạo dẫn xuất với chất hai chức là hữu ích, ví dụ, để liên kết ngang kháng thể kháng CD79b với chất nền trợ giúp không thể hòa tan trong nước hoặc bề mặt để sử dụng trong phương pháp tinh chế các kháng thể kháng CD79b và ngược lại. Các chất liên kết ngang được sử dụng phổ biến bao gồm, *ví dụ*, 1,1-bis(diazoacetyl)-2-phenyletan, glutaraldehyt, N-hydroxysucxinimit este, ví dụ, este với axit 4-azidosalicylic, các imidoeste hai chức đồng nhất, bao gồm disucxinimidyl este như 3,3'-dithiobis(sucxinimidylpropionat), các maleimit hai chức như bis-N-maleimido-1,8-octan và các chất như metyl-3-[(p-azidophenyl)dithio]propioimidat.

Các cải biến khác bao gồm amin hóa khử các gốc glutaminyl và asparaginyl thành các gốc glutamyl và aspartyl tương ứng, hydroxyl hóa prolin và lysin, phosphoryl hóa các nhóm hydroxyl các gốc seryl hoặc threonyl, metyl hóa các nhóm α-amino lysin, arginin, và các chuỗi phụ histidin [T.E. Creighton, Proteins: Structure and Molecular Properties, W.H. Freeman & Co., San Francisco, pp. 79-86 (1983)], axetyl hóa amin tận cùng N và amin hóa nhóm carboxyl tận cùng C.

Kiểu cải biến cộng hóa trị khác về kháng thể kháng CD79b bao gồm trong phạm vi của sáng chế bao gồm làm thay đổi mẫu glycosyl hóa nguyên gốc kháng thể hoặc polypeptit. "Làm thay đổi mẫu glycosyl hóa nguyên gốc" cho mục đích ở đây có nghĩa là loại bỏ một hoặc nhiều phần carbohydrat được phát hiện trong trình tự nguyên gốc kháng thể kháng CD79b (bằng cách loại bỏ vị trí glycosyl hóa gạch dưới hoặc bằng cách loại bỏ glycosyl hóa bằng phương pháp hóa học và/hoặc enzym), và/hoặc bổ sung một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa mà không có mặt trong trình tự nguyên gốc kháng thể kháng CD79b. Ngoài ra, cụm từ bao gồm thay đổi chất lượng trong glycosyl hóa protein nguyên gốc, bao gồm thay đổi trong bản chất và tỷ lệ các phần carbohydrat khác nhau có mặt.

Glycosyl hoá kháng thể và các polypeptit khác thường được liên kết N hoặc liên kết O. N được liên kết đề cập đến việc gắn kết của phần carbohydrat với chuỗi phụ của gốc asparagin. Các trình tự tripeptit asparagin-X-serin và asparagin-X-threonin, trong đó X là axit amin bất kỳ ngoại trừ prolin, là trình tự nhận biết để gắn kết enzym của phần carbohydrat với chuỗi phụ asparagin. Do đó, sự có mặt của các trình tự tripeptit này trong polypeptit tạo ra vị trí glycosyl hoá hiệu lực. Gycosyl hoá

được liên kết O đề cập đến việc gắn kết của một trong số các đường N-axeylgalactosamin, galactoza hoặc xyloza với axit hydroxyamin, thông thường nhất là serin hoặc threonin, mặc dù 5-hydroxyprolin hoặc 5-hydroxylysin cũng có thể được sử dụng.

Ngoài vị trí glycosyl hóa kháng thể kháng CD79b có thể được kết thúc thông thường bằng cách làm thay đổi trình tự axit amin sao cho nó chứa một hoặc nhiều trình tự tripeptit được mô tả trên đây (đối với vị trí glycosyl hoá liên kết N). Sự thay đổi được thực hiện, ví dụ, bằng cách bổ sung hoặc thay thế, một hoặc nhiều gốc serin hoặc threonin với trình tự kháng thể kháng CD79b nguyên gốc (đối vơi các vị trí glycosyl hóa được liên kết O). Trình tự axit amin kháng thể kháng CD79b có thể tuỳ ý được thay đổi thông qua các thay đổi ở mức ADN, cụ thể là bằng cách tạo đột biến ADN mã hóa kháng thể kháng CD79b ở các bazơ được chọn lọc trước sao cho các mã bộ ba được sinh ra mà sẽ được dịch mã thành các axit amin mong muốn.

Phương pháp khác để gia tăng số lượng các phần carbohydrat trên kháng thể kháng CD79b là bằng cách cặp đôi hóa học hoặc enzym của glycosit với polypeptit. Các phương pháp này được mô tả trong lĩnh vự này, *ví dụ*, trong WO 87/05330 công bố ngày 11/9/1987, và trong Aplin and Wriston, CRC Crit. Rev. Biochem., pp. 259-306 (1981).

Việc loại bỏ các phần carbohydrat có mặt trên kháng thể kháng CD79b có thể được kết thúc về mặt hóa học hoặc enzym bằng các thay thế đột biến các mã bộ ba mã hóa các gốc axit amin mà như là các đích để glycosyl hóa. Các kỹ thuật deglycosyl hóa hóa học là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả, ví dụ, bởi Hakimuddin, *et al.*, Arch. Biochem. Biophys., 259:52 (1987) và bởi Edge *et al.*, Anal. Biochem., 118:131 (1981). Phân tách enzym các phần carbohydrat trên polypeptit có thể đạt được bằng cách sử dụng nhiều endo- và exo-glycosidaza như được mô tả bởi Thotakura *et al.*, Meth. Enzymol., 138:350 (1987).

Kiểu cải biến cộng hóa trị khác của kháng thể kháng CD79b bao gồm cho kháng thể này liên kết với một trong số nhiều polyme không protein, *ví dụ*, polyetylen glycol (PEG), polypropylen glycol, hoặc polyoxyalkylen, theo cách được nêu trong các bằng Mỹ số 4,640,835; 4,496,689; 4,301,144; 4,670,417; 4,791,192 hoặc 4,179,337. kháng thể này cũng có thể được bắt trong vi nang được tạo ra, ví dụ bằng các kỹ thuật giọt tụ hoặc bằng cách polyme hoá bề mặt phân giới (ví dụ,

hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmethacylat), tương ứng), trong các hệ phân phát thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi hạt albumin, vi nhũ hoá, hạt nano và nang nano) hoặc đại nhũ hoá. Các kỹ thuật này được mô tả trong Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Oslo, A., Ed., (1980).

Kháng thể kháng CD79b theo sáng chế cũng có thể được cải biến theo cách tạo thành các phân tử khảm bao gồm kháng thể kháng CD79b được dung hợp với polypeptit khác, dị hợp hoặc trình tự axit amin.

Theo một phương án, phân tử khảm này bao gồm dung hợp kháng thể kháng CD79b với tag polypeptit mà tạo ra epitop mà kháng thể kháng tag có thể gắn kết chọn lọc. Epitop tag thường được đặt ở tận cùng amino hoặc tận cùng carboxyl của kháng thể kháng CD79b. Sự có mặt của các dạng epitop-tag của kháng thể kháng CD79b có thể được nhận biết bằng cách sử dụng kháng thể đối với tag polypeptit. Ngoài ra, điều kiện epitop tag làm cho kháng thể kháng CD79b có khả năng được tinh chế dễ dàng bằng cách tinh chế ái lực bằng cách sử dụng kháng thể kháng tag hoặc kiểu chất nền ái lực khác mà gắn kết với epitop tag. Các tag polypepti khác và các kháng thể tương ứng của chúng là đã biết trong lĩnh vực này. Các ví dụ bao gồm poly-histidin (poly-his) hoặc poly-histidin-glyxin (poly-his-gly) tags; flu HA tag polypeptit và kháng thể 12CA5 của nó [Field *et al.*, Mol. Cell. Biol., 8:2159-2165 (1988)]; c-myc tag và các kháng thể 8F9, 3C7, 6E10, G4, B7 và 9E10 của nó [Evan *et al.*, Molecular and Cellular Biology, 5:3610-3616 (1985)]; và Herpes Simplex virus glycoprotein D (gD) tag và kháng thể của nó [Paborsky *et al.*, Protein Engineering, 3(6):547-553 (1990)]. Các tag polypeptit khác bao gồm Flag-peptit [Hopp *et al.*, BioTechnology, 6:1204-1210 (1988)]; KT3 epitop peptit [Martin *et al.*, Science, 255:192-194 (1992)]; α-tubulin epitop peptit [Skinner *et al.*, J. Biol. Chem., 266:15163-15166 (1991)]; và gen T7 10 protein peptit tag [Lutz-Freyermuth *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 87:6393-6397 (1990)].

Theo phương án khác, phân tử khảm có thể bao gồm dung hợp kháng thể kháng CD79b với globulin miễn dịch hoặc vùng cụ thể của globulin miễn dịch. Đối với dạng hóa trị hai của phân tử khảm (cũng đề cập đến "hút bám miễn dịch"), dạng này có thể là vùng Fc của phân tử IgG. Các dung hợp Ig tốt hơn là bao gồm thay thế dạng có thể hòa tan (miền chuyển màng được loại bỏ hoặc được làm bất hoạt) của kháng thể kháng CD79b ở vị trí của ít nhất là một vùng biến đổi trong phân tử Ig. Phương án được ưu

tiên đặc biệt, dung hợp globulin miễn dịch bao gồm các vùng khung, CH2 và CH3, hoặc khung, CH1, CH2 và CH3 của phân tử IgG1. Để sản xuất các dung hợp globulin miễn dịch cũng xem bằng Mỹ số 5,428,130 cấp ngày 27/6/1995.

F. Sản xuất kháng thể kháng CD79b

Phần mô tả dưới đây đề cập đến trước tiên để sản xuất kháng thể kháng CD79b bằng cách nuôi cấy các tế bào được biến nạp hoặc chuyển nhiễm với vectơ chứa axit nucleic mã hoá kháng thể kháng CD79b. Dĩ nhiên, đã được dự định rằng các phương pháp khác nhau, mà đã biết trong lĩnh vực này, có thể được dùng để sản xuất kháng thể kháng CD79b. Ví dụ, trình tự axit amin thích hợp hoặc các phần của chúng, có thể được sản xuất bằng cách tổng hợp peptit trực tiếp bằng cách sử dụng các kỹ thuật pha rắn [xem, *ví dụ*, Stewart *et al.*, Solid-Phase Peptide Synthesis, W.H. Freeman Co., San Francisco, CA (1969); Merrifield, J. Am. Chem. Soc., 85:2149-2154 (1963)]. Tổng hợp protein *In vitro* có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật thông thường hoặc bằng cách tự trưởng thành. Tổng hợp tự trưởng thành có thể được kết thúc, ví dụ, bằng cách sử dụng Applied Biosystems Peptide Synthesizer (Foster City, CA) bằng cách sử dụng các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các phần khác nhau của kháng thể kháng CD79b có thể được tổng hợp về mặt hóa học riêng và kết hợp bằng cách sử dụng các phương pháp hóa học hoặc enzym để sản xuất kháng thể kháng CD79b mong muốn.

1. Phân lập ADN mã hoá kháng thể kháng CD79b

ADN mã hóa kháng thể kháng CD79b có thể thu được từ thư viện ADN bổ trợ được sản xuất từ mô được cho là có kháng thể kháng CD79b ARN thông tin và biểu hiện nó ở mức có thể phát hiện. Do đó, ADN kháng thể kháng CD79b của người có thể thu được thông thường từ thư viện ADN bổ trợ được sản xuất từ mô của người. Gen mã hóa kháng thể kháng CD79b cũng có thể thu được từ thư viện gen hoặc bằng các quy trình tổng hợp đã biết (*ví dụ*, tự tổng hợp axit nucleic).

Các thư viện có thể được sàng với các đầu dò (như các kháng thể kháng CD79b hoặc oligonucleotit có ít nhất là khoảng 20-80 bazơ) được dự định để nhận biết gen quan tâm hoặc protein được mã hóa bởi nó. Sàng ADN bổ trợ hoặc thư viện gen với đầu dò được chọn lọc có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các quy trình tiêu chuẩn, như được mô tả trong Sambrook *et al.*, Molecular Cloning: A Laboratory Manual (New York: Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1989). Các phương pháp

khác để phân lập gen mã hóa kháng thể kháng CD79b là để sử dụng phương pháp PCR [Sambrook *et al.*, *nêu trên*; Dieffenbach *et al.*, PCR Primer: A Laboratory Manual (Cold Spring Harbor Laboratory Press, 1995)].

Các kỹ thuật để sàng thư viện ADN bổ trợ là đã biết trong lĩnh vực này. Các trình tự oligonucleotit được chọn lọc như các đầu dò sẽ có chiều dài đủ và rõ ràng một cách đầy đủ mà không xác thực được giảm thiểu. Oligonucleotit tốt hơn là được đánh dấu sao cho có thể được phát hiện ngay khi lai với ADN trong thư viện sẽ được sàng. Các phương pháp đánh dấu là đã biết trong lĩnh vực này và bao gồm việc sử dụng đánh dấu phóng xạ như ATP được đánh dấu ^{32}P, đánh dấu biotinyl hóa hoặc enzym. Các điều kiện lai, bao gồm tính nghiêm ngặt vừa phải và tính nghiệm ngặt cao, được đề xuất trong Sambrook *et al.*, *nêu trên*.

Các trình tự được nhận biết trong phương pháp sàng thư viện này có thể được so sánh và được sắp xếp theo các trình tự đã biết được lưu giữ và hiện có trong các dữ liệu hiện có như GenBank hoặc các cơ sở dữ liệu trình tự riêng khác. Trình tự nhận biết (ở mức axit amin hoặc nucleotit) trong các nhóm phân tử được xác định hoặc ngang qua toàn bộ chiều dài trình tự có thể được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này và như được mô tả ở đây.

Axit nucleic có trình tự mã hóa protein có thể thu được bằng cách sàng ADN bổ trợ chọn lọc hoặc các thư viện gen bằng cách sử dụng trình tự axit amin được suy diễn được bộc lộ ở đây trong lần thứ nhất, và, nếu cần, bằng cách sử dụng các phương pháp mồi thông thường như được mô tả trong Sambrook *et al.*, *nêu trên*, để phát hiện các tiền chất và xử lý các chất trung gian của ARN thông tin mà đã không được sao chép ngược vào ADN bổ trợ.

2. Chọn lọc và biến nạp tế bào chủ

Các tế bào chủ được chuyển nhiễm hoặc được biến nạp với các vectơ biểu hiện hoặc tạo đơn dòng được mô tả ở đây để sản xuất kháng thể kháng CD79b và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến nếu thích hợp để cảm biến đoạn khởi đầu, chọn lọc biến nạp hoặc khuếch đại gen mã hóa các trình tự mong muốn. Các điều kiện nuôi cấy, như môi trường, nhiệt độ, độ pH và tương tự, có thể được chọn lọc bởi chuyên gia trong lĩnh vực này mà không trải qua thử nghiệm. Thông thường, về nguyên tắc, quy trình và các kỹ thuật thực tiễn tạo tối đa khả năng sản xuất môi trường nuôi cấy tế bào có thể được phát hiện trong Mammalian Cell

Biotechnology: a Practical Approach, M. Butler, ed. (IRL Press, 1991) và Sambrook *et al.*, *nêu trên.*

Các phương pháp chuyển nhiễm tế bào nhân điển hình và biến nạp tế bào chưa có nhân điển hình, có nghĩa là đưa ADN vào vật chủ sao cho ADN này có thể sao chép, như là bộ phận ngoài nhiễm sắc thể hoặc nhiễm sắc thể, là đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, ví dụ, $CaCl_2$, $CaPO_4$, qua trung gian liposom, polyetylen-gycol/DMSO và bắn điện. Phụ thuộc vào tế bào chủ được sử dụng, việc biến nạp được thực hiện bằng cách sử dụng các kỹ thuật tiêu chuẩn thích hợp đối với tế bào này. Xử lý canxi dùng canxi clorua, như được mô tả trong Sambrook *et al.*, *nêu trên*, hoặc bắn tia điện thường được dùng đối với sinh vật chưa có nhân điển hình. Việc lây nhiễm với *Agrobacterium tumefaciens* là được sử dụng để biến nạp một số tế bào thực vật, như được mô tả bởi Shaw *et al.*, Gene, 23:315 (1983) và WO 89/05859 được công bố ngày 29/6/1989. Đối với các tế bào động vật có vú mà không có vách tế bào, phương pháp kết tủa canxi phosphat của Graham and van der Eb, Virology, 52:456-457 (1978) có thể được dùng. Khía cạnh chung về lây nhiễm hệ tế bào chủ động vật có vú đã được mô tả trong bằng Mỹ số 4,399,216. Việc biến nạp vào nấm men thường được thực hiện theo phương pháp của Van Solingen *et al.*, J. Bact., 130:946 (1977) và Hsiao *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. (USA), 76:3829 (1979). Tuy nhiên, các phương pháp khác để đưa ADN vào tế bào, như bằng cách vi tiêm nhân, bắn tia điện, dung hợp nguyên mẫu vi khuẩn với tế bào nguyên vẹn hoặc các polycation, *ví dụ*, polybren, polyornithin, có thể được sử dụng. Đối với các kỹ thuật khác nhau để biến nạp tế bào động vật có vú, xem Keown *et al.*, Methods in Enzymology, 185:527-537 (1990) và Mansour *et al.*, Nature, 336:348-352 (1988).

Các tế bào chủ thích hợp để tạo đơn dòng hoặc biểu hiện ADN trong vectơ ở đây bao gồm tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình, nấm men hoặc sinh vật nhân điển hình bậc cao.

a. Tế bào chủ chưa có nhân điển hình

Các sinh vật chưa có nhân điển hình thích hợp bao gồm nhưng không chỉ giới hạn đến archaebacteria và eubacteria, như các sinh vật Gram dương hoặc Gram âm, ví dụ, Enterobacteriaceae như *E. coli.* Các chủng *E. coli* khác nhau hiện có phổ biến, như chủng MM294 (ATCC 31,446); *E. coli* X1776 (ATCC 31,537); *E. coli* chủng W3110 (ATCC 27,325) và K5 772 (ATCC 53,635). Các tế bào chủ sinh vật chưa có nhân điển

hình khác thích hợp bao gồm *E. coli*, *Enterobacter*, *Erwinia*, *Klebsiella*, *Proteus*, *Salmonella*, ví dụ, *Salmonella typhimurium*, *Serratia*, ví dụ, *Serratia marcescans*, và *Shigella*, cũng như *Bacilli* như *B. subtilis* và *B. licheniformis* (ví dụ, *B. licheniformis* 41P được mô tả trong DD 266,710 được công bố ngày 12/4/1989), *Pseudomonas* như *P. aeruginosa*, *Rhizobia, Vitreoscilla, Paracoccus và Streptomyces*. Các ví dụ này nhằm minh họa nhưng không giới hạn. Chủng W3110 là chủng vật chủ hoặc vật chủ ban đầu được đặc biệt ưu tiên bởi vì nó là chủng vật chủ phổ biến đối với sự lên men ống dẫn ADN tái tổ hợp. Tốt hơn là, tế bào chủ tiết lượng nhỏ enzym phân giải protein. Ví dụ, chủng W3110 (Bachmann, Cellular và Molecular Biology, vol. 2 (Washington, D.C.: American Society for Microbiology, 1987), pp. 1190-1219; Số lưu giữ ATCC 27,325) có thể được cải biến để tác động đến đột biến gen trong gen mã hóa protein nội sinh đối với vật chủ, với các ví dụ về các vật chủ này bao gồm chủng *E. coli* W3110 1A2, mà có kiểu gen hoàn chỉnh *tonA*; chủng *E. coli* W3110 9E4, mà có kiểu gen hoàn chỉnh *tonA ptr3*; chủng *E. coli* W3110 27C7 (ATCC 55,244), mà có kiểu gen hoàn chỉnh *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT kan*^{r}; chủng *E. coli* W3110 37D6, mà có kiểu gen hoàn chỉnh *tonA ptr3 phoA E15 (argF-lac)169 degP ompT rbs7 ilvG kan*^{r}; chủng *E. coli* W3110 40B4, mà là chủng 37D6 với đột biến loại bỏ *degP* không kháng kanamyxin; chủng *E. coli W3110* 33D3 có kiểu gen W3110 Δ*fhuA (ΔtonA) ptr3 lac Iq lacL8 ΔompTΔ(nmpc-fepE) degP41 kan*^{R} (bằng Mỹ số 5,639,635) và chủng *E. coli* có đột biến proteaza chất bao được mô tả trong bằng Mỹ số 4,946,783 cấp ngày 7/8/1990. Các chủng khác và các dẫn xuất của chúng, như *E. coli* 294 (ATCC 31,446), *E. coli* B, *E. coli*□ 1776 (ATCC 31,537) và *E. coli* RV308(ATCC 31,608) cũng thích hợp. Các ví dụ này nhằm minh hoạ mà không làm giới hạn. Các phương pháp tạo cấu trúc các dẫn xuất của vi khuẩn bất kỳ được nêu trên đây có kiểu gen được xác định là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả, ví dụ, trong Bass *et al.*, Proteins, 8:309-314 (1990). Thường cần thiết để chọn lọc vi khuẩn thích hợp để tiến hành xem xét khả năng sao chép của bản sao ở tế bào vi khuẩn. Ví dụ, các loài *E. coli*, Serratia, hoặc Salmonella có thể được sử dụng thích hợp làm vật chủ khi các plasmit đã biết như pBR322, pBR325, pACYC177, hoặc pKN410 được sử dụng để tạo ra bản sao. Thông thường, tế bào chủ sẽ tiết lượng nhỏ enzym thủy phân protein và các chất ức chế proteaza bổ sung có thể mong muốn được kết hợp vào môi trường nuôi cấy tế

bào. Theo cách khác, các phương pháp tạo đơn dòng *in vitro*, ví dụ, PCR hoặc phản ứng polymeraza axit nucleic khác, là thích hợp.

Toàn bộ chiều dài kháng thể, các mảnh kháng thể và các protein dung hợp kháng thể có thể được tạo ra ở vi khuẩn, cụ thể là khi glycosyl hoá và chức năng phản ứng kích thích Fc là không cần thiết, như khi kháng thể điều trị được liên hợp với chất độc tế bào (ví dụ, độc tố) và liên hợp miễn dịch bằng cách tự bản thân thể hiện hiệu quả phá vỡ tế bào khối u. Toàn bộ chiều dài kháng thể có nửa chu kỳ phân rã lớn hơn. Việc sản xuất ở E. coli là nhanh hơn và hiệu quả kinh tế hơn. Để biểu hiện các mảnh kháng thể và các polypeptit ở vi khuẩn, xem, ví dụ, bằng Mỹ số 5,648,237 (Carter et. al.), bằng Mỹ số 5,789,199 (Joly et al.), và bằng Mỹ số 5,840,523 (Simmons et al.) mà mô tả vùng khởi đầu dịch mã (TIR) và trình tự tín hiệu để tối ưu hoá sự biểu hiện và tiết. Sau khi biểu hiện, kháng thể được phân lập từ bột nhão tế bào E. coli trong phần có thể hoà tan và có thể được tinh chế qua, ví dụ, cột protein A hoặc G phụ thuộc kiểu phụ. Việc tinh chế cuối cùng có thể được thực hiện tương tự với quy trình tinh chế kháng thể được biểu hiện, ví dụ ở tế bào CHO.

b. Tế bào chủ sinh vật nhân điển hình

Ngoài sinh vật chưa có nhân điển hình, các vi khuẩn nhân điển hình như nấm sợi hoặc nấm men là dòng vô tính thích hợp hoặc vật chủ biểu hiện đối với các vectơ mã hóa kháng thể kháng CD79b. *Saccharomyces cerevisiae* là được sử dụng phổ biến các vi sinh vật chủ nhân điển hình bậc thấp. Các sinh vật khác bao gồm *Schizosaccharomyces pombe* [Beach and Nurse, Nature, 290: 140 (1981); EP 139,383 được công bố ngày 2/5/1985]; vật chủ *Kluyveromyces* (Bằng Mỹ số 4,943,529; Fleer *et al.*, Bio/Technology, 9:968-975 [1991]) như, *ví dụ*, *K. lactis* (MW98-8C, CBS683, CBS4574; Louvencourt *et al.*, J. Bacteriol., 154(2):737-742 [1983]), *K. fragilis* (ATCC 12,424), *K. bulgaricus* (ATCC 16,045), *K. wickeramii* (ATCC 24,178), *K. waltii* (ATCC 56,500), *K. drosophilarum* (ATCC 36,906; Van den Berg *et al.*, Bio/Technology, 8:135 [1990]), *K. thermotolerans*, và *K. marxianus; yarrowia* (EP 402,226); *Pichia pastoris* (EP 183,070; Sreekrishna *et al.*, J. Basic Microbiol., 28:265-278 [1988]); *Candida; Trichoderma reesia* (EP 244,234); *Neurospora crassa* (Case *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 76:5259-5263 [1979]); *Schwanniomyces* như *Schwanniomyces occidentalis* (EP 394,538 được công bố ngày 31/10/1990); và nấm sợi như, *ví dụ*, *Neurospora, Penicillium*, *Tolypocladium* (WO 91/00357 được công bố

ngày 10/1/1991), và vật chủ *Aspergillus* như *A. nidulans* (Ballance *et al.*, Biochem. Biophys. Res. Commun., 112:284-289 [1983]; Tilburn *et al.*, Gene, 26:205-221 [1983]; Yelton *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 81:1470-1474 [1984]) và *A. niger* (Kelly và Hynes, EMBO J., 4:475-479 [1985]). Các nấm men metylotropic là thích hợp ở đây và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, nấm men có khả năng phát triển trên metanol chọn lọc từ giống bao gồm *Hansenula*, *Candida, Kloeckera, Pichia, Saccharomyces, Torulopsis, và Rhodotorula*. Danh mục các loài đặc hiệu mà là làm mẫu của lớp nấm men này có thể được tìm thấy trong C. Anthony, The Biochemistry of Methylotrophs, 269 (1982).

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể kháng CD79b được glycosyl hóa là có nguồn gốc từ sinh vật đa bào. Các ví dụ về các tế bào của động vật có xương sống bao gồm các tế bào côn trùng như *Drosophila* S2 và *Spodoptera* Sf9 cũng như các tế bào thực vật, như môi trường nuôi cấy tế bào của cây bông, ngô, khoai tây, đậu nành, cây dã yên thảo, cà chua và thuốc lá. Nhiều chủng vi khuẩn và các biến thể và các tế bào chủ côn trùng cho phép tương ứng từ vật chủ như *Spodoptera frugiperda* (sâu bướm), *Aedes aegypti* (muỗi), *Aedes albopictus* (muỗi), *Drosophila melanogaster* (ruồi dấm) và *Bombyx mori* đã được xác định. Nhiều chủng vi rút để chuyển nhiễm là đã biết thông thường, ví dụ, biến thể L-1 của *Autographa californica* NPV và chủng Bm-5 của *Bombyx mori* NPV, và các vi rút này có thể được sử dụng như vi rút ở đây theo sáng chế, cụ thể là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Tuy nhiên, quan tâm lớn nhất ở tế bào động vật có xương sống và nhân giống tế bào động vật có xương sống trong môi trường nuôi cấy (môi trường nuôi cấy mô) đã trở thành quy trình thông thường. Các ví dụ về các dòng tế bào chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bởi SV40 (COS-7, ATCC CRL 1651); dòng thận phôi của người (293 hoặc 293 tế bào được tạo dưới đơn dòng để phát triển trong môi trường nuôi cấy huyền phù, Graham et al., J. Gen Virol. 36:59 (1977)); tế bào thận chuột nhắt (BHK, ATCC CCL 10); tế bào buồng trứng chuột đồng trung Quốc/-DHFR (CHO, Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77:4216 (1980)); tế bào sertoli của chuột (TM4, Mather, Biol. Reprod. 23:243-251 (1980)); tế bào thận khỉ (CV1 ATCC CCL 70); tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76, ATCC CRL-1587); tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung của người (HELA, ATCC CCL 2); tế bào thận chó (MDCK, ATCC CCL 34); tế bào gan chuột nước (BRL 3A, ATCC CRL 1442); tế bào phổi

người (W138, ATCC CCL 75); tế bào gan người (Hep G2, HB 8065); khối u vú của chuột (MMT 060562, ATCC CCL51); tế bào TRI (Mather et al., Annals N.Y. Acad. Sci. 383:44-68 (1982)); tế bào MRC 5; tế bào FS4; và dòng tế bào ung thư gan của người (Hep G2).

Các tế bào chủ được biến nạp với vectơ biểu hiện hoặc tạo đơn dòng được mô tả trên đây để sản xuất kháng thể kháng CD79b và được nuôi cấy trong môi trường dinh dưỡng thông thường được cải biến nếu thích hợp để cảm biến đoạn khởi đầu, chọn lọc thể biến nạp hoặc khuếch đại gen mã hoá trình tự mong muốn.

3. Chọn lọc và sử dụng vectơ có thể sao chép

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể theo sáng chế, axit nucleic (*ví dụ*, ADN bổ trợ hoặc ADN hệ gen) mã hóa nó được phân lập và được chèn vào vectơ có thể sao chép để tạo đơn dòng tiếp (khuếch đại ADN) hoặc để biểu hiện. ADN mã hoá kháng thể được phân lập dễ dàng và được tạo trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (*ví dụ*, bằng cách sử dụng các đầu dò oligonucleotit mà có khả năng gắn kết đặc hiệu với gen mã hoá chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể). Nhiều vectơ là hiện có. Việc lựa chọn vectơ phụ thuộc vào tế bào chủ sẽ được sử dụng. Thông thường, các tế bào chủ được ưu tiên là có nguồn gốc từ sinh vật chưa có nhân điển hình hoặc sinh vật nhân điển hình (thường là động vật có vú).

Vectơ, ví dụ, ở dạng plasmit, cosmit, hạt virút hoặc thể thực khuẩn. Trình tự axit nucleic thích hợp có thể được chèn vào vectơ bằng nhiều quy trình. Thông thường, ADN được chèn vào (các) vị trí endonucleaza giới hạn thích đã biết trong lĩnh vực này. Các hợp phần vectơ thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, một hoặc nhiều trình tự tín hiệu, điểm khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, đoạn khởi đầu và trình tự giới hạn sao chép. Cấu trúc của vectơ thích hợp chứa một hoặc nhiều hợp phần này dùng các kỹ thuật thắt tiêu chuẩn mà đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

CD79b có thể được tạo ra một cách tái tổ hợp không chỉ trực tiếp, mà còn polypeptit dung hợp với polypeptit tương đồng khác loại, mà có thể là trình tự tín hiệu hoặc polypeptit khác có vị trí phân cắt đặc hiệu ở tận cùng N của protein trưởng thành hoặc polypeptit. Thông thường, trình tự tín hiệu có thể là hợp phần của vectơ hoặc nó có thể là một phần của kháng thể kháng CD79b mã hóa ADN mà được chèn vào vectơ. Trình tự tín hiệu có thể là trình tự tín hiệu sinh vật chưa có nhân điển hình được chọn

lọc, ví dụ, từ nhóm phosphataza kiềm, penixilinaza, lpp, hoặc các gen dẫn đầu nội độc tố ổn định nhiệt II. Đối với trình tự tín hiệu tiết nấm men có thể là, *ví dụ*, gen dẫn đầu invertaza của nấm men, gen dẫn đầu yếu tố alpha (bao gồm gen dẫn đầu yếu tố α *Saccharomyces và Kluyveromyces*, gen sau được mô tả trong bằng Mỹ số 5,010,182), hoặc gen dẫn đầu axit phosphataza, gen dẫn đầu *C. albicans* glucoamylaza (EP 362,179 được công bố 4/4/1990), hoặc tín hiệu được mô tả trong WO 90/13646 được công bố 15/11/1990. Trong biểu hiện tế bào động vật có vú, các trình tự tín hiệu động vật có vú có thể được sử dụng để tiết trực tiếp protein, như các trình tự tín hiệu từ các polypeptit được tiết của các loài giống nhau hoặc có liên quan, cũng như các đoạn khởi đầu tiết vi rút.

a. Tế bào chủ sinh vật chưa có nhân điển hình

Các trình tự polynucleotit mã hoá các hợp phần polypeptit của kháng thể theo sáng chế có thể thu được bằng cách sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp tiêu chuẩn. Các trình tự polynucleotit mong muốn có thể được phân lập và được tạo trình tự từ tế bào sản xuất kháng thể như tế bào lai. Theo cách khác, các polynucleotit có thể được tổng hợp bằng cách sử dụng bộ tổng hợp nucleotit hoặc kỹ thuật PCR. Khi thu được, các trình tự mã hoá polypeptit được chèn vào vectơ tái tổ hợp có thể sao chép và biểu hiện các polynucleotit dị hợp ở vật chủ sinh vật chưa có nhân điển hình. Nhiều vectơ là hiện có và đã biết trong lĩnh vực này có thể được sử dụng cho mục đích theo sáng chế. Việc chọn lọc vectơ thích hợp sẽ phụ thuộc chủ yếu vào kích thước của axit nucleic sẽ được chèn vào vectơ và tế bào chủ cụ thể sẽ được biến nạp với vectơ. Mỗi vectơ chứa các hợp phần khác nhau, phụ thuộc vào chức năng của nó (việc khuếch đại hoặc biểu hiện polynucleotit dị hợp hoặc cả hai) và tính tương thích của nó với tế bào chủ cụ thể trong đó nó cư trú.

Thông thường, các vectơ plasmit chứa trình tự sao chép và đối chứng mà có nguồn gốc từ các loài thích hợp với tế bào chủ được sử dụng liên quan đến vật chủ này. Các vectơ biểu hiện và tạo đơn dòng chứa trình tự axit nucleic mà làm cho vectơ có khả năng sao chép ở một hoặc nhiều tế bào chủ được chọn, cũng như tạo ra trình tự mà có khả năng tạo ra sự chọn lọc kiểu hình ở tế bào được biến nạp. Các trình tự này là đã biết đối với nhiều vi khuẩn, nấm men và vi rút. Điểm khởi đầu sao chép từ plasmit pBR322, mà chứa gen mã hoá sức kháng ampixilin (Amp) và tetraxyclin (Tet) và do đó tạo ra phương pháp dễ dàng để nhận biết các tế bào được biến nạp, là thích hợp đối

với hầu hết vi khuẩn Gram âm, nguồn gốc 2μ plasmit là thích hợp đối với nấm men và nguồn gốc vi rút khác nhau (SV40, polyoma, adenovirút, VSV hoặc BPV) là hữu ích để tạo đơn dòng vectơ ở tế bào động vật có vú. pBR322, các dẫn xuất của nó hoặc các plasmit vi khuẩn khác hoặc thể thực khuẩn cũng có thể chứa hoặc được cải biến để chứa, đoạn khởi đầu mà có thể được sử dụng bởi vi sinh vật để biểu hiện protein nội sinh. Các ví dụ về các dẫn xuất pBR322 được sử dụng để biểu hiện đối với các kháng thể cụ thể được mô tả chi tiết trong Carter et al., bằng Mỹ số 5,648,237.

Ngoài ra, vectơ thể thực khuẩn chứa trình tự bản sao và đối chứng mà thích hợp với vi sinh vật chủ có thể được sử dụng làm vectơ biến nạp liên quan đến các vật chủ này. Ví dụ, thể thực khuẩn như GEM.TM.-11 có thể được sử dụng trong sản xuất vectơ tái tổ hợp mà có thể được sử dụng để biến nạp tế bào chủ nhạy như *E. coli* LE392.

Vectơ biểu hiện theo sáng chế có thể bao gồm hai hoặc nhiều cặp đoạn khởi đầu-cistron, mã hoá mỗi hợp phần polypeptit. Các đoạn khởi đầu là trình tự điều chỉnh không được dịch mã được khu trú ngược dòng (5') với cistron mà điều biến sự biểu hiện của nó. Các đoạn khởi đầu sinh vật chưa có nhân điển hình thường được chia thành hai lớp, có thể cảm ứng và cấu trúc. Đoạn khởi đầu có thể cảm biến là đoạn khởi đầu mà khởi đầu các mức gia tăng sao chép của cistron dưới sự kiểm soát của nó trong đáp ứng với cách thay đổi trong điều kiện nuôi cấy, ví dụ có mặt hoặc không có mặt chất dinh dưỡng hoặc thay đổi nhiệt độ.

Số lượng lớn đoạn khởi đầu được nhận biết bởi nhiều tế bào chủ hiệu lực là đã biết. Đoạn khởi đầu được chọn lọc có thể được liên kết hiệu quả với cistron ADN mã hoá chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng bằng cách loại bỏ đoạn khởi đầu khỏi ADN nguồn qua sự tiêu hoá enzym giới hạn và chèn vào trình tự đoạn khởi đầu được phân lập vào vectơ theo sáng chế. Trình tự đoạn khởi đầu nguyên gốc và nhiều đoạn khởi đầu dị hợp có thể được sử dụng để khuếch đại và/hoặc biểu hiện trực tiếp của các gen đích. Theo một số phương án, đoạn khởi đầu dị hợp được sử dụng, như chúng thường cho phép sao chép lớn hơn và hiệu xuất lớn hơn của gen đích được biểu hiện như được so với đoạn khởi đầu polypeptit đích nguyên gốc.

Các đoạn khởi đầu được nhận biết bởi nhiều tế bào chủ hiệu lực là đã biết. Các đoạn khởi đầu thích hợp để sử dụng với vật chủ sinh vật chưa có nhân điển hình bao gồm đoạn khởi đầu PhoA, β-galactamaza và các hệ đoạn khởi đầu lactoza [Chang et

al., Nature, 275:615 (1978); Goeddel et al., Nature, 281:544 (1979)], phosphataza kiềm, hệ đoạn khởi đầu tryptophan (trp) [Goeddel, Nucleic Acids Res., 8:4057 (1980); EP 36,776] và đoạn khởi đầu lai như *tac* [deBoer et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 80:21-25 (1983)] hoặc đoạn khởi đầu *trc*. Các đoạn khởi đầu để sử dụng trong các hệ vi khuẩn cũng sẽ chứa trình tự Shine-Dalgarno (S.D.) được liên kết hiệu quả với ADN mã hoá kháng thể kháng CD79b. Tuy nhiên, các đoạn khởi đầu khác mà có chức năng ở vi khuẩn (như vi khuẩn hoặc đoạn khởi đầu thể thực khuẩn đã biết khác) là cũng thích hợp. Các trình tự nucleotit của chúng đã được công bố, nhờ đó có khả năng làm cho gen giết chết hiệu quả để thắt chúng thành cistron mã hoá các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng đích (Siebenlist et al. (1980) Cell 20: 269) bằng cách sử dụng các cầu liên kết hoặc các khớp để cung cấp các vị trí giới hạn cần thiết bất kỳ.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, mỗi cistron vectơ tái tổ hợp bao gồm hợp phần trình tự tín hiệu tiết mà mà di chuyển trực tiếp của polypeptit được biểu hiện qua màng. Thông thường, trình tự tín hiệu có thể là hợp phần của vectơ hoặc nó có thể là một phần của polypeptit ADN đích mà được chèn vào vectơ. Trình tự tín hiệu được chọn cho mục đích theo sáng chế sẽ là trình tự mà được nhận biết và được xử lý (nghĩa là được phân tách bởi peptidaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Đối với tế bào chủ sinh vật chưa có nhân điển hình mà không nhận biết và xử lý trình tự tín hiệu nguyên gốc với polypeptit dị hợp, trình tự tín hiệu được thế bởi trình tự tín hiệu sinh vật chưa có nhân điển hình được chọn, ví dụ, từ nhóm bao gồm phosphataza kiềm, penixilinaza, Ipp, hoặc các gen dẫn đền nội độc tố ổn định nhiệt II (STII), LamB, PhoE, PelB, OmpA và MBP. Theo một phương án theo sáng chế, các trình tự tín hiệu được sử dụng trong cistron của hệ biểu hiện là trình tự tín hiệu STII hoặc biến thể của chúng.

Theo khía cạnh khác, việc sản xuất globulin miễn dịch theo sáng chế có thể xảy ra ở tế bào chất của tế bào chủ và do đó không cần sự có mặt của trình tự tín hiệu tiết trong mỗi cistron. Liên quan đến vấn đề này, các chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch được biểu hiện, được gấp và được kết hợp để tạo thành globulin chức năng trong tế bào chất. Một số chủng vật chủ (ví dụ, các chủng *E. coli trxB*$^-$) tạo ra các điều kiện của tế bào chất mà là thích hợp để tạo thành liên kết disulfua, nhờ đó cho phép gấp đúng và kết hợp các dưới đơn vị protein được biểu hiện. Proba and Pluckthun *Gene*, 159:203 (1995).

Sáng chế đề xuất hệ biểu hiện trong đó tỷ lệ lượng hợp phần polypeptit được biểu hiện có thể điều biến để tối đa hiệu xuất của kháng thể được tiết và kết hợp đúng theo sáng chế. Việc cải biến này được hoàn thành ít nhất là một phần bằng cách điều biến đồng thời cường độ dịch mã đối với các hợp phần polypeptit.

Một kỹ thuật để điều biến cường độ sao chép được mô tả trong Simmons et al., bằng Mỹ số 5,840,523. Sử dụng các biến thể của vùng khởi đầu dịch mã (TIR) trong cistron. Đối với TIR, một loạt axit amin hoặc biến thể trình tự axit amin có thể được tạo ra với khoảng cường độ dịch mã, nhờ đó tạo ra phương pháp thông thường mà để điều chỉnh yếu tố này đối với mức biểu hiện mong muốn của chuỗi đặc hiệu. Các biến thể TIR có thể được sinh ra bằng kỹ thuật đột biến gen thông thường mà dẫn đến thay đổi mã bộ ba có thể thay đổi trình tự axit amin, mặc dù các thay đổi bất hoạt trong trình tự nucleotit là được ưu tiên. Khác với trong TIR có thể bao gồm, ví dụ, các thay đổi theo số lượng hoặc khoảng trống của trình tự Shine-Dalgarno, cùng với các thay đổi trong trình tự tín hiệu. Một phương pháp tạo ra trình tự tín hiệu đột biến là tạo ra "ngân hàng mã bộ ba" ở lúc bắt đầu trình tự mã hoá mà không thay đổi trình tự axit min của trình tự tín hiệu (nghĩa là, các thay đổi bất hoạt). Điều này có thể được hoàn thành bằng cách thay đổi vị trí nucleotit thứ ba của mỗi mã bộ ba; ngoài ra, một số axit amin, như leuxin, serin và arginin, có nhiều vị trí thứ nhất và thứ hai mà có thể bổ sung phức hợp vào ngân hàng. Phương pháp đột biến gen này được mô tả chi tiết trong Yansura et al. (1992) *METHODS: A Companion to Methods in Enzymol.* 4:151-158.

Tốt hơn là, bộ vectơ được sinh ra với khoảng cường độ TIR đối với mỗi cistron ở đây. Bộ giới hạn này tạo ra sự so sánh mức biểu hiện của mỗi chuỗi cũng như hiệu xuất của sản phẩm kháng thể mong muốn dưới các kết hợp cường độ TIR khác nhau. Các cường độ TIR có thể được xác định bằng cách định lượng mức biểu hiện của gen thông báo như được mô tả chi tiết trong Simmons et al. U.S. Pat. No. 5, 840,523. Dựa trên sự so sánh cường độ dịch mã, TIR riêng rẽ mong muốn được chọn sẽ được kết hợp với các cấu trúc vecatơ biểu hiện theo sáng chế.

b. Các tế bào chủ sinh vật nhân điển hình

Các hợp phần vectơ thường bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, một hoặc nhiều yếu tố sau đây: trình tự tín hiệu, điểm khởi đầu sao chép, một hoặc nhiều gen đánh dấu, yếu tố tăng cường, đoạn khởi đầu và trình tự kết thúc phiên mã.

(1) Hợp phần trình tự tín hiệu

Vectơ để sử dụng trong tế bào chủ nhân điển hình cũng có thể chứa trình tự tín hiệu hoặc polypeptit khác có vị trí phân tách đặc hiệu ở tận cùng N của protein trưởng thành hoặc polypeptit quan tâm. Trình tự tín hiệu khác loại được chọn lọc có thể là trình tự mà được nhận biết và được xử lý (nghĩa là, được phân tách bởi peptidaza tín hiệu) bởi tế bào chủ. Trong biểu hiện tế bào động vật có vú, các trình tự tín hiệu động vật có vú cũng như đoạn khởi đầu kích thích bài tiết virút, ví dụ, tín hiệu gD phức hỗ biến, là hiện có.

ADN đối với vùng tiền chất này được thắt trong khung đọc thành ADN mã hoá kháng thể.

(2) Điểm khởi đầu sao chép

Thông thường, hợp phần điểm khởi đầu sao chép là không cần thiết đối với vectơ biểu hiện động vật có vú. Ví dụ, nguồn gốc SV40 thường có thể chỉ được sử dụng bởi vì nó chứa đoạn khởi đầu sớm.

3) Hợp phần gen chọn lọc

Vectơ biểu hiện và tạo đơn dòng sẽ thường chứa gen chọn lọc, cũng được gọi là gen đánh dấu có thể chọn lọc. Các gen chọn lọc thường mã hoá protein mà (a) tạo ra sức kháng với các thuốc kháng sinh hoặc các độc tố khác, ví dụ, ampixilin, neomyxin, metotrexat hoặc tetraxyclin, (b) thiếu hụt dinh dưỡng thụ động bổ sung, nếu thích hợp hoặc (c) cung cấp dinh dưỡng tới hạn hiện không có từ môi trường phức, ví dụ, gen mã hoá D-alanin raxemaza đối với *Bacilli*.

Một ví dụ về sơ đồ chọn lọc sử dụng dược chất để làm ngừng sự phát triển của tế bào chủ. Các tế bào này là được biến nạp thành công với gen khác loại tạo ra protein tạo ra sức kháng dược chất và do đó sống qua được chế độ chọn lọc. Các ví dụ về chọn lọc chiếm ưu thế trội sử dụng các dược chất neomyxin, axit mycophenolic và hygromyxin.

Ví dụ khác về các gen đánh dấu chọn lọc thích hợp đối với các tế bào động vật có vú là các gen mà có khả năng nhận biết các tế bào có thẩm quyền nhận axit nucleic mã hoá kháng thể kháng CD79b, như DHFR, thymidin kinaza, metalothionein-I và -II, tốt hơn là gen metalothionein của động vật linh trưởng, adenosin deaminaza, ornithin decarboxylaza, v.v.. Tế bào chủ thích hợp khi DHFR kiểu dại được dùng là thiếu hụt dòng tế bào CHO ở hoạt tính DHFR (ví dụ, ATCC CRL-9096), được sản xuất và được

nhân giống như được mô tả bởi Urlaub et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:4216 (1980). Ví dụ, tế bào được biến nạp với gen chọn lọc DHFR được xác định lần đầu tiên bằng cách nuôi cấy tất cả thể biến nạp trong môi trường nuôi cấy mà chứa methotrexat (Mtx), chất đối kháng cạnh tranh của DHFR. Theo cách khác, tế bào chủ (cụ thể là vật chủ kiểu dại mà chứa DHFR nội sinh) được biến nạp hoặc cùng biến nạp với các trình tự ADN mã hoá kháng thể, DHFR protein kiểu dại và gen đánh dấu chọn lọc khác như aminoglycosit 3'-phosphotransferaza (APH) có thể được chọn lọc bằng cách phát triển tế bào trong môi trường chứa gen chất chọn lọc đối với gen đánh dấu có thể chọn lọc như chất kháng sinh aminoglycosit, *ví dụ,* kanamyxin, neomyxin, hoặc G418. Xem bằng Mỹ số 4,965,199.

Gen chọn lọc thích hợp để sử dụng trong nấm men là gen *trp*1 có mặt trong plasmit YRp7 nấm men [Stinchcomb et al., Nature, 282:39 (1979); Kingsman et al., Gene, 7:141 (1979); Tschemper et al., Gene, 10:157 (1980)]. Gen *trp*1 tạo ra gen đánh dấu chọn lọc đối với chủng nấm men đột biến thiếu khả năng phát triển trong tryptophan, ví dụ, ATCC số 44076 hoặc PEP4-1 [Jones, Genetics, 85:12 (1977)].

(4) Hợp phần đoạn khởi đầu

Vectơ biểu hiện và tạo đơn dòng thường chứa đoạn khởi đầu được liên kết hiệu quả với trình tự axit nucleic mã hoá kháng thể kháng CD79b trực tiếp để tổng hợp ARN thông tin. Đoạn khởi đầu được nhận biết bởi nhiều tế bào chủ hiệu lực là đã biết.

Đoạn khởi đầu là đã biết đối với sinh vật nhân điển hình có vùng giàu AT được định vị khoảng từ 25 đến 30 bazơ ngược dòng từ vị trí mà ở đó khởi đầu sao chép. Trình tự khác được phát hiện từ 70 đến 80 bazơ ngược dòng từ khởi đầu sao chép của nhiều gen là vùng CNCAAT ở đó N có thể là nucleotit bất kỳ. Ở đầu 3' của hầu hết gen của sinh vật nhân điển hình là trình tự AATAAA mà có thể là tín hiệu để bổ sung đuôi poly A vào đầu 3' của trình tự mã hoá. Tất cả trình tự này có thể được lồng thích hợp vào vectơ biểu hiện sinh vật nhân điển hình.

Các ví dụ về trình tự thúc đẩy thích hợp để sử dụng với các vật chủ nấm men bao gồm các đoạn khởi đầu đối với 3-phosphoglyxerat kinaza [Hitzeman et al., J. Biol. Chem., 255:2073 (1980)] hoặc các enzym thuỷ phân đường khác [Hess et al., J. Adv. Enzyme Reg., 7:149 (1968); Holland, Biochemistry, 17:4900 (1978)], như enolaza, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza, hexokinaza, pyruvat decarboxylaza,

phosphofructokinaza, glucoza-6-phosphat isomeraza, 3-phosphoglyxerat mutaza, pyruvat kinaza, triosephosphat isomeraza, phosphoglucoza isomeraza và glucokinaza.

Các đoạn khởi đầu sao chép, mà cảm biến đoạn khởi đầu có thuận lợi sao chép bổ sung được kiểm soát bởi các điều kiện phát triển, là các vùng đoạn khởi đầu đối với rượu dehydrogenaza 2, isoxytochrom C, phosphataza axit, các enzym thoái biến liên quan đến trao đổi nitơ, metalothionein, glyxeraldehyt-3-phosphat dehydrogenaza và enzym đáp ứng với tiêu thụ maltoza và galactoza. Các vectơ đoạn khởi đầu thích hợp để sử dụng trong biểu hiện nấm men còn được mô tả trong EP 73,657.

Sự sao chép kháng thể kháng CD79b từ vectơ ở các tế bào chủ động vật có vú được kiểm soát, ví dụ, bằng các đoạn khởi đầu thu được hệ gen của các vi rút như polyoma virút, fowlpox virút (UK 2,211,504 công bố ngày 5/7/1989), adenovirút (như Adenovirút 2), vi rút u nhú bò, xacôm vi rút ở chim, xytomegalovirút, retrovirút, vi rút viêm gan B và Simian Virút 40 (SV40), từ các đoạn khởi đầu động vật có vú khác loại, ví dụ, đoạn khởi đầu actin hoặc đoạn khởi đầu globulin miễn dịch, và từ các đoạn khởi đầu sốc nhiệt, các đoạn khởi đầu này được đề xuất là tương hợp với hệ tế bào chủ.

Các đoạn khởi đầu sớm và muộn của vi rút SV40 thu được thông thường như mảnh giới hạn SV40 mà cũng chứa điểm khởi đầu sao chép vi rút SV40. Gen khởi đầu sớm của xytomegalovirút của người thu được thông thường như mảnh giới hạn HindIII E. Hệ biểu hiện ADN ở vật chủ động vật có vú bằng cách sử dụng vi rút u nhu vú của bò làm vectơ được bộc lộ trong bằng Mỹ số 4,419,446. Sự cải biến của hệ này được mô tả trong 4,601,978. Cũng xem Reyes et al., Nature 297:598-601 (1982), mô tả sự biểu hiện của β-interferon ADN bổ trợ của người ở các tế bào của chuột dưới sự kiểm soát của đoạn khởi đầu thymidin kinaza từ vi rút phức hỗ biến. Theo cách khác, nhắc lại tận cùng chiều dài Rous Sarcoma Virus có thể được sử dụng làm đoạn khởi đầu.

(5) Hợp phần yếu tố tăng cường

Sao chép ADN mã hoá kháng thể kháng CD79b bởi sinh vật nhân điển hình bậc cao có thể được gia tăng bằng cách lồng trình tự tăng cường vào vectơ. Các gen tăng cường là các yếu tố hoạt động cis của ADN, thường là khoảng từ 10 đến 300bp, mà hoạt động trên gen tăng cường để gia tăng sự sao chép. Nhiều trình tự tăng cường là đã biết từ gen của động vật có vú (globin, elastaza, albumin, α-fetoprotein, và insulin). Thông thường, tuy nhiên, sẽ sử dụng gen tăng cường từ tế bào vi rút nhân điển hình.

Các ví dụ bao gồm gen tăng cường SV40 trên mặt sau của điểm khởi đầu sao chép (bp 100-270), gen tăng cường khởi đầu sớm xytomegalovirút, gen tăng cường polyoma trên mặt sau của điểm khởi đầu sao chép và gen tăng cường adenovirút. Cũng xem Yaniv, Nature 297: 17-18 (1982) mô tả các yếu tố tăng cường để hoạt hoá đoạn khởi đầu của sinh vật nhân điển hình. Yếu tố tăng cường có thể ghép vào vectơ ở vị trí 5 ' hoặc 3' với trình tự mã hoá kháng thể kháng CD79b, nhưng thường được định vị ở vị trí 5' từ đoạn khởi đầu.

(6) Hợp phần kết thúc phiên mã

Vectơ biểu hiện được sử dụng trong các tế bào chủ nhân điển hình (nấm men, nấm, côn trùng, thực vật, động vật, con người học tế bào được tạo nhân từ sinh vật đa bào khác) cũng sẽ chứa trình tự cần thiết để kết thúc sao chép và để làm ổn định ARN thông tin. Các trình tự này là hiện có phổ biến từ 5' và, thường là 3', các vùng không được dịch mã của tế bào nhân điển hình hoặc các ADN vi rút hoặc ADN bổ trợ. Các vùng này chứa các mảnh nucleotit được sao chép như các mảnh được polyadenyl hoá trong phần không được dịch mã của ARN thông tin mã hoá kháng thể kháng CD79b. Một hợp phần kết thúc sao chép hữu ích là vùng polyadenyl hoá hormon phát triển của bò. Xem WO94/11026 và vectơ biểu hiện được bộc lộ ở đây.

Các phương pháp, vectơ và tế bào chủ khác thích hợp để hợp với tổng hợp kháng thể kháng CD79b ở môi trường nuôi cấy tế bào động vật có xương sống tái tổ hợp được mô tả trong Gething et al., Nature, 293:620-625 (1981); Mantei et al., Nature, 281:40-46 (1979); EP 117,060; và EP 117,058.

4. Nuôi cấy tế bào chủ

Tế bào chủ được sử dụng để sản xuất kháng thể kháng CD79b theo sáng chế có thể được nuôi cấy trong nhiều môi trường.

a. Tế bào chủ chưa có nhân điển hình

Các tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình để sản xuất polypeptit theo sáng chế được phát triển trong môi trường đã biết trong lĩnh vực này và thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ chọn lọc. Các ví dụ về môi trường thích hợp bao gồm dịch lỏng (LB) cộng các chất bổ sung dinh dưỡng cần thiết. Theo một số phương án, môi trường này cũng chứa chất chọn lọc, được chọn dựa trên cấu trúc của vectơ biểu hiện, để cho phép phát triển chọn lọc tế bào sinh vật chưa có nhân điển hình chứa vectơ biểu hiện. Ví dụ, ampixilin được bổ sung vào môi trường để phát triển tế bào biểu hiện gen kháng ampixilin. Các

chất bổ sung cần thiết bất kỳ ngoài cacbon, nitơ và các nguồn phosphat vô cơ cũng có thể được bao gồm ở các nồng độ thích hợp được đưa vào riêng rẽ hoặc kết hợp với chất bổ sung hoặc môi trường khác như nguồn nitơ phức hợp. Tuỳ ý, môi trường nuôi cấy có thể chứa một hoặc nhiều chất khử được chọn từ nhóm bao gồm glutathion, xystein, xystamin, thioglycolat, dithioerythritol và dithiothreitol.

Các tế bào chủ sinh vật chưa có nhân điển hình được nuôi cấy ở nhiệt độ thích hợp. Để phát triển *E. coli*, ví dụ, khoảng nhiệt độ được ưu tiên nằm trong khoảng từ 20□C đến 39□C, tốt hơn nữa là khoảng từ 25□C đến 37□C, còn tốt hơn nữa là khoảng 30□C. Độ pH của môi trường có thể là độ pH bất kỳ nằm trong khoảng từ 5 đến 9, phụ thuộc chủ yếu vào sinh vật chủ. Đối với *E. coli*, độ pH tốt hơn là nằm trong khoảng từ 6,8 đến 7,4, và tốt hơn nữa là khoảng 7,0.

Nếu đoạn khởi đầu có thể cảm biến được sử dụng trong vectơ biểu hiện theo sáng chế, sự biểu hiện protein được cảm biến dưới các điều kiện thích hợp để hoạt hoá đoạn khởi đầu. Theo một khía cạnh theo sáng chế, các đoạn khởi đầu PhoA được sử dụng để kiểm soát sự sao chép của polypeptit. Do đó, các tế bào chủ được biến nạp được nuôi cấy trong môi trường giới hạn phosphat để cảm biến. Tốt hơn là, môi trường giới hạn phosphat là môi trường C.R.A.P (xem, ví dụ, Simmons et al., *J. Immunol. Methods* (2002), 263:133-147). Nhiều chất cảm biến khác là được sử dụng, theo cấu trúc vectơ được dùng, là đã biết trong lĩnh vực này.

Theo một phương án, các polypeptit được biểu hiện theo sáng chế được tiết vào và được thu hồi từ chất bao của tế bào chủ. Việc thu hồi protein thường bao gồm phá vỡ cơ thể vi sinh vật, thường bằng cách như sốc thẩm thấu, siêu âm hoặc làm tan. Khi các tế bào bị phá vỡ, mảnh vỡ tế bào hoặc toàn bộ tế bào có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm hoặc lọc. Các protein này còn có thể được tinh chế, ví dụ, bằng cách sắc ký nhựa ái lực. Theo cách khác, các protein có thể được vận chuyển vào môi trường nuôi cấy tế bào và phân lập ở đó. Các tế bào có thể được loại bỏ khỏi môi trường này và dịch nổi môi trường này được lọc và cô đặc để tinh chế tiếp protein được tạo ra. Các polypeptit được biểu hiện còn được phân lập và được xác định bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết thông thường như điện di gel polyacrylamit (PAGE) và thử nghiệm giọt Tây.

Theo một khía cạnh theo sáng chế, sản xuất kháng thể được thực hiện với lượng lớn bởi quy trình lên men. Các quy trình lên men mẻ-bể trên phạm vi lớn khác nhau là

hiện có để sản xuất các protein tái tổ hợp. Việc lên men trên phạm vi lớn có ít nhất là 1000 lit theo thể tích, tốt hơn là khoảng từ 1,000 đến 100,000 lit theo thể tích. Các bình lên men này sử dụng thiết bị khuấy tuần hoàn để phân phát oxy và chất dinh dưỡng, đặc biệt là glucoza (nguồn cacbon/năng lượng được ưu tiên). Việc lên men phạm vi nhỏ thường đề cập đến sự lên men ở bình lên men mà không nhiều hơn khoảng 100 lit theo thể tích và có thể nằm trong khoảng từ 1 lit đến 100 lit.

Trong quy trình lên men, việc cảm biến biểu hiện của protein thường được khởi đầu sau khi tế bào được phát triển dưới các điều kiện thích hợp đến mật độ mong muốn, ví dụ OD_{550} khoảng 180-220, ở giai đoạn mà tế bào trong pha dừng sớm. Nhiều chất cảm biến có thể được sử dụng, theo cấu trúc vectơ được dùng, như được biết trong lĩnh vực này và được mô tả trên đây. Các tế bào có thể được phát triển trong thời gian ngắn hơn trước khi cảm biến. Các tế bào thường được cảm biến trong khoảng 12-50 giờ, mặc dù thời giam cảm biến lâu hơn hoặc ngắn hơn có thể được sử dụng.

Để cải thiện hiệu xuất sản xuất và chất lượng của polypeptit theo sáng chế, các điều kiện lên men khác nhau có thể được cải biến. Ví dụ, để cải thiện sự kết hợp và gấp đúng kháng thể polypeptit được tiết, các vectơ bổ sung biểu hiện quá mức các chaperon protein, như Dsb protein (DsbA, DsbB, DsbC, DsbD và hoặc DsbG) hoặc FkpA (peptidylprolyl cis,trans-isomeraza với hoạt tính chaperon) có thể được sử dụng để cùng biến nạp tế bào chủ chưa có nhân điển hình. Các chaperon đã được chứng minh để tạo thuận lợi cho gấp đúng và tính tan của protein dị hợp được sản xuất ở tế bào chủ vi khuẩn. Chen et al. (1999) *J Bio Chem* 274:19601-19605; Georgiou et al., bằng Mỹ số 6,083,715; Georgiou et al., bằng Mỹ số 6,027,888; Bothmann and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17100-17105; Ramm and Pluckthun (2000) *J. Biol. Chem.* 275:17106-17113; Arie et al. (2001) *Mol. Microbiol.* 39:199-210.

Để giảm thiểu sự thuỷ phân protein của protein dị hợp được biểu hiện (đặc biệt là các protein dễ bị thuỷ phân protein), một số chủng vật chủ thiếu hụt các enzym phân huỷ protein có thể được sử dụng theo sáng chế. Ví dụ, các chủng tế bào chủ có thể được cải biến để tác động đến (các) đột biến gen trong gen mã hoá các proteaza vi khuẩn đã biết như Proteaza III, OmpT, DegP, Tsp, Proteaza I, Proteaza Mi, Proteaza V, Proteaza VI và các kết hợp của chúng. Một số chủng thiếu hụt *E. coli* proteaza là hiện có và được mô tả trong, ví dụ, Joly et al. (1998), *nêu trên*; Georgiou et al., bằng Mỹ số

5,264,365; Georgiou et al., bằng Mỹ số 5,508,192; Hara et al., *Microbial Drug Resistance*, 2:63-72 (1996).

Theo một phương án, các chủng *E. coli* thiếu hụt enzym phân huỷ protein và được biến nạp với plasmit biểu hiện quá mức một hoặc nhiều chaperon protein được sử dụng làm tế bào chủ trong hệ biểu hiện theo sáng chế.

b. Các tế bào chủ sinh vật nhân điển hình

Môi trường hiện có bán trên thị trường như Ham's F10 (Sigma), Minimal Essential Medium ((MEM), (Sigma), RPMI-1640 (Sigma), và Dulbecco's Modified Eagle's Medium ((DMEM), Sigma) là thích hợp để nuôi cấy tế bào chủ. Ngoài ra, môi trường bất kỳ được mô tả trong Ham et al., Meth. Enz. 58:44 (1979), Barnes et al., Anal. Biochem.102:255 (1980), các bằng Mỹ số 4,767,704; 4,657,866; 4,927,762; 4,560,655; hoặc 5,122,469; WO 90/03430; WO 87/00195; hoặc bằng Mỹ số 30,985 có thể được sử dụng làm môi trường nuôi cấy đối với các tế bào chủ. Môi trường bất kỳ trong số các môi trường này có thể được bổ sung nếu cần với các hormon và/hoặc yếu tố phát triển khác (như insulin, transferrin, hoặc các yếu tố phát triển biểu bì), các muối (như natri clorua, canxi, magiê và phosphat), các chất đệm (như HEPES), các nucleotit (như denosin và thymidin), các chất kháng sinh (như dược chất GENTAMYCIN™), các yếu tố tạo vết (được xác định như các hợp chất vô cơ thường có mặt ở nồng độ cuối cùng trong khoảng micromol) và glucoza hoặc nguồn năng lượng tương đương. Các chất bổ sung cần thiết khác bất kỳ cũng có thể liên quan ở nồng độ thích hợp mà đã được biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này. Các điều kiện nuôi cấy, như nhiệt độ, độ pH và tương tự, là các điều kiện được sử dụng trước với tế bào chủ được chọn lọc để biểu hiện và đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này.

5. Phát hiện khuếch đại/biểu hiện gen

Khuếch đại và/hoặc biểu hiện gen có thể được xác định trong mẫu trực tiếp, ví dụ, bằng giọt Nam, giọt Tây thông thường để định lượng sao chép ARN thông tin (Thomas, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 77:5201-5205 [1980]), tạo giọt nhỏ (phân tích ADN), hoặc lai *in situ*, bằng cách sử dụng đầu dò đánh dấu thích hợp, dựa trên các trình tự được đề xuất ở đây. Theo cách khác, các kháng thể có thể được dùng mà có thể nhận biết phức kép đặc hiệu, bao gồm phức kép ADN, phức kép ARN và phức kép lai ADN-ARN hoặc phức kép ADN-protein. Các kháng thể lần lượt có thể được đánh

dấu và thử nghiệm có thể được thực hiện trong đó phức kép được gắn kết với bề mặt, sao cho ngay khi tạo thành phức kép trên bề mặt, sự có mặt của kháng thể được gắn kết với phức kép có thể được phát hiện.

Theo cách khác, sự biểu hiện gen có thể được xác định bằng các phương pháp miễn dịch, như nhuộm mô miễn dịch tế bào hoặc các phần mô và thử nghiệm môi trường nuôi cấy tế bào hoặc dịch cơ thể, để định lượng trực tiếp sự biểu hiện của sản phẩm gen. Các kháng thể là hữu ích để nhuộm mô miễn dịch và/hoặc thử nghiệm các dịch lỏng mẫu có thể là đơn dòng hoặc đa dòng, và có thể được tạo ra ở động vật có vú bất kỳ. Theo cách thông thường, các kháng thể có thể được tạo ra đối với CD79b polypeptit trình tự nguyên gốc hoặc đối với peptit tổng hợp dựa trên các trình tự ADN được đề xuất ở đây hoặc đối với trình tự ngoại sinh được dung hợp với CD79b ADN và mã hóa epitop kháng thể cụ thể.

6. Tinh chế kháng thể kháng CD79b

Các dạng kháng thể kháng CD79b có thể được thu hồi từ môi trường nuôi cấy hoặc từ các dịch tan tế bào chủ. Nếu được gắn kết màng, nó có thể được giải phóng từ màng bằng cách sử dụng dung dịch tẩy rửa thích hợp (*ví dụ,* Triton-X 100) hoặc bằng cách phân tách enzym. Các tế bào được dùng trong biểu hiện của kháng thể kháng CD79b có thể bị gián đoạn bởi các phương pháp vật lý hoặc hóa học khác nhau, như tạo chu trình làm tan lạnh, siêu âm, gián đoạn cơ học hoặc các chất làm tan tế bào.

Có thể mong muốn tinh chế kháng thể kháng CD79b từ các protein hoặc polypeptit tế bào tái tổ hợp. Các quy trình sau đây là ví dụ của các quy trình tinh chế thích hợp: bằng cách cất phân đoạn trên cột trao đổi ion; kết tinh etanol; HPLC pha ngược; sắc ký trên silic oxit hoặc trên nhựa trao đổi cation như DEAE; tạo đích sắc ký; SDS-PAGE; kết tủa amoni sulfat; lọc gel bằng cách sử dụng, ví dụ, Sephadex G-75; cột protein A Sepharose để loại bỏ chất gây ô nhiễm như IgG; và các cột tạo chelat kim loại để gắn kết các dạng tag epitop của kháng thể kháng CD79b. Các phương pháp khác nhau về tinh chế protein có thể được dùng và các phương pháp này là đã biết trong lĩnh vực này và được mô tả ví dụ trong Deutscher, Methods in Enzymology, 182 (1990); Scopes, Protein Purification: Principles and Practice, Springer-Verlag, New York (1982). (Các) bước tinh chế chọn lọc sẽ phụ thuộc, ví dụ, vào bản chất của quy trình sản xuất được sử dụng và kháng thể kháng CD79b cụ thể được tạo ra.

Khi sử dụng các kỹ thuật tái tổ hợp, kháng thể có thể được sản xuất nội bào, trong khoảng trống ngoại vi hoặc được tiết trực tiếp vào môi trường. Nếu kháng thể được sản xuất nội bào, như là bước đầu tiên, mảnh vỡ dạng hạt, các tế bào chủ hoặc các mảnh được làm tan, có thể được loại bỏ, ví dụ, bằng cách ly tâm hoặc siêu lọc. Carter et al., Bio/Technology 10:163-167 (1992) mô tả quy trình phân lập kháng thể mà được tiết vào khoảng trống ngoại vi của *E. coli.* Một cách vắn tắt, bột nhão tế bào được làm tan với sự có mặt của natri axetat (độ pH = 3,5), EDTA, và phenylmetylsulfonylflorua (PMSF) trong khoảng 30 phút. Mảnh vỡ tế bào có thể được loại bỏ bằng cách ly tâm. Trong đó kháng thể được tiết vào môi trường, dịch nổi từ hệ biểu hiện này thường có thể được cô đặc lần đầu tiên bằng cách sử dụng thiết bị lọc cô đặc protein hiện có bán trên thị trường, ví dụ, thiết bị siêu lọc Amicon hoặc Millipore Pellicon. Chất ức chế proteaza như PMSF có thể được bao gồm trong bước bất kỳ trên đây để ức chế phân giải protein và các chất kháng sinh có thể liên quan để ngăn ngừa sự phát triển của các chất gây ô nhiễm ngẫu nhiên.

Chế phẩm kháng thể được sản xuất từ tế bào có thể được tinh chế bằng cách sử dụng, ví dụ, sắc ký hydroxylapatit, điện di gel, thẩm tách và sắc ký ái lực, với sắc ký ái lực là kỹ thuật tinh chế được ưu tiên. Tính thích hợp của protein A như phối tử ái lực phụ thuộc các loài và isotyp của miền globulin miễn dịch Fc có mặt trong kháng thể. Protein A có thể được sử dụng để tinh chế kháng thể mà dựa trên các chuỗi nặng γl, γ2, hoặc γ4 của người (Lindmark et al., J. Immunol. Meth. 62:1-13 (1983)). Protein G là được nhắc lại đối với tất cả các isotyp của chuột và đối với γ3 của người (Guss et al., EMBO J. 5:15671575 (1986)). Chất nền mà phối tử ái lực được gắn vào thông thường nhất là agaroza, nhưng chất nền khác là hiện có. Các chất nền ổn định cơ học như thuỷ tinh rỗng được kiểm soát hoặc poly(styrenedivinyl)benzen cho phép tốc độ dòng chảy nhanh hơn và thời gian xử lý ngắn hơn có thể đạt được với agaroza. Khi kháng thể này bao gồm miền CH3, nhựa Bakerbond ABX™ (J. T. Baker, Phillipsburg, NJ) là hữu ích để tinh chế. Các kỹ thuật khác để tinh chế protein như cất phân đoạn trên cột trao đổi ion, kết tinh etanol, HPLC pha ngược, sắc ký trên silic oxit, sắc ký trên heparin SEPHAROSE™ sắc ký trên nhựa trao đổi anion hoặc cation (như cột axit polyaspartic), tạo đích nhiễm sắc thể, SDS-PAGE, và kết tinh amoni sulfat cũng hiện có phụ thuộc vào kháng thể sẽ được thu hồi.

Theo (các) bước tinh chế sơ bộ bất kỳ, hỗn hợp gồm kháng thể quan tâm và các chất gây ô nhiễm có thể được cho vào sắc ký tương tác kỵ nước độ pH thấp bằng cách sử dụng chất đệm tách rửa ở độ pH nằm trong khoảng từ 2,5 đến 4,5, tốt hơn là được thực hiện ở nồng độ muối thấp (ví dụ, từ 0-0,25M muối).

G. Dược phẩm

Thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) theo sáng chế có thể được dùng bằng đường thích hợp bất kỳ đối với tình trạng bệnh sẽ được điều trị. ADC sẽ thường được dùng ngoài đường tiêu hoá, nghĩa là, tiêm truyền, dưới da, bắp, trong da, tĩnh mạch, trong vỏ và ngoài màng cứng.

Để điều trị bệnh ung thư, theo một phương án, thể liên hợp kháng thể-dược chất là được dùng qua đường tiêm tĩnh mạch. Liều được dùng qua đường tiêm là nằm trong khoảng từ 1μg/m^2 đến 10,000 μg/m^2 /liều, thường là một liều/tuần trong tổng số một, hai, ba hoặc bốn liều. Theo cách khác, khoảng liều là nằm trong khoảng từ 1μg/m^2 đến 1000μg/m^2, khoảng từ 1 μg/m^2 đến 800 μg/m^2, khoảng 1μg/m^2 đến 600 μg/m^2, khoảng từ 1 μg/m^2 đến 400 μg/m^2, khoảng từ 10 μg/m^2 đến 500 μg/m^2, khoảng từ 10 μg/m^2 đến 300 μg/m^2, khoảng từ 10 μg/m^2 đến 200 μg/m^2, và khoảng từ 1 μg/m đến 200 μg/m. Liều có thể được dùng một lần/ngày, một lần/tuần, nhiều lần/tuần, nhưng ít hơn một lần/ngày, nhiều lần/tháng nhưng ít hơn một lần/ngày, nhiều lần/tháng nhưng ít hơn một lần/tuần, một lần/tháng hoặc không liên tục để làm giảm hoặc làm nhẹ triệu chứng bệnh. Việc dùng có thể là liên tục ở khoảng thời gian được bộc lộ bất kỳ cho đến khi làm giảm khối u hoặc triệu chứng bệnh ung thư mô bạch huyết, bạch cầu sẽ được điều trị. Việc dùng có thể là liên tục sau khi đạt được giảm hoặc làm nhẹ triệu chứng ở đó việc làm giảm hoặc làm nhẹ là được kéo dài bằng cách dùng liên tục.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp làm giảm bệnh tự miễn dịch, bao gồm cho người bệnh mắc bệnh tự miễn dịch dùng lượng có hiệu quả điều trị của liên hợp kháng thể MA79b được làm thích hợp với người-dược chất theo một trong số các phương án trên đây. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể được dùng qua đường tĩnh mạch hoặc dưới da. Thể liên hợp kháng thể-dược chất được dùng trong tĩnh mạch ở liều nằm trong khoảng từ 1μg/m^2 đến 100 mg/ m^2 /liều và theo phương án đặc biệt, liều là nằm trong khoảng từ 1μg/m^2 đến 500μg/m^2. Liều này có thể được dùng một lần/ngày, một lần/tuần, nhiều lần/tuần, nhưng ít hơn một lần/ngày, nhiều lần/tháng, nhưng ít hơn một lần/ngày, nhiều lần/tháng, nhưng ít hơn một lần/tuần, một lần/tháng hoặc không liên

tục để làm nhẹ hoặc làm giảm triệu chứng bệnh. Việc dùng có thể là liên tục ở khoảng thời gian bất kỳ cho đến làm nhẹ hoặc làm giảm triệu chứng bệnh tự miễn dịch sẽ được điều trị. Việc dùng có thể là liên tục sau khi việc làm nhẹ hoặc giảm triệu chứng bệnh là đạt được trong đó việc làm giảm hoặc làm nhẹ này kéo dài bởi việc dùng liên tục.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp điều trị rối loạn liên quan đến tế bào B bao gồm cho người bệnh mắc rối loạn tế bào B, như rối loạn tăng sinh tế bào B (bao gồm nhưng không giới hạn đến u lympho và bệnh bạch cầu) hoặc bệnh tự miễn dịch, dùng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể MA79b được làm thích hợp với người theo một trong các phương án bất kỳ nêu trên, mà kháng thể không được liên hợp với phân tử độc tố tế bào hoặc phân tử có thể đánh dấu. kháng thể này sẽ thường được dùng ở liều nằm trong khoảng từ 1μg/m^2 đến 1000 mg/m^2.

Theo một khía cạnh, sáng chế còn đề xuất dược phẩm bao gồm ít nhất là một kháng thể kháng CD79b theo sáng chế và/hoặc ít nhất là một liên hợp miễn dịch của chúng và/hoặc ít nhất là một thể liên hợp kháng thể-dược chất kháng CD79b theo sáng chế. Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm 1) kháng thể theo sáng chế và/hoặc liên hợp miễn dịch của chúng, và (2) chất mang dược dụng. Theo một số phương án, dược phẩm bao gồm kháng thể theo sáng chế và/hoặc liên hợp miễn dịch của chúng và tuỳ ý (2) ít nhất là một chất điều trị bổ sung. Các chất điều trị bổ sung bao gồm nhưng không chỉ giới hạn đến, các chất được mô tả dưới đây. ADC sẽ thường được dùng ngoài đường tiêu hó, nghĩa là tiêm truyền, dưới da, trong bắp, trong tĩnh mạch, trogn da, trong nội mạc tuỷ và trong màng cứng.

Chế phẩm điều trị bao gồm kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch CD79b được sử dụng theo sáng chế được bào chế để bảo quản bằng cách trộn kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch, có mức tinh khiết mong muốn với chất mang dược dụng tuỳ ý, tá dược hoặc các chất ổn định (Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), ở dạng dung dịch trong nước hoặc chế phẩm được làm đông khô. Các chất mang, tá dược hoặc chất làm ổn định có thể chấp nhận là không độc đối với người nhận ở các liều và nồng độ được dùng và bao gồm các chất đệm như axetat, Tris, phosphat, xitrat và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hoá bao gồm axit ascorbic và methionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni

clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua, benzethoni clorua; phenol, butyl hoặc rượu benzyl; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorcinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit phân tử lượng thấp (nhỏ hơn khoảng 10 gốc); protein như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin hoặc lysin; monosacarit, disacarit và các carbohydrat khác bao gồm glucoza, mannoza hoặc dextrin; các chất tạo chelat như EDTA; các chất trương lực như trehaloza natri clorua; caá đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; chất hoạt động bề mặt như polysorbat; các ion tạo muối như natri; phức hợp kim loại (ví dụ, phức hợp Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như TWEEN®, PLURONICS® hoặc polyetylen glycol (PEG). Dược phẩm sẽ được sử dụng để dùng in vivo thường là tiệt trùng. Điều này đạt được nhanh chóng bằng cách lọc thông qua màng lọc tiệt trùng.

Chế phẩm ở đây cũng có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất nếu cần cho chỉ định cụ thể sẽ được điều trị, tốt hơn là với các hoạt tính bổ sung mà không có tác dụng ngược với nhau. Ví dụ, ngoài kháng thể kháng CD79b, có thể mong muốn bao gồm trong một chế phẩm, kháng thể bổ sung, ví dụ kháng thể kháng CD79b thứ hai mà gắn kết epitop khác nhau trên CD79b polypeptit hoặc kháng thể đối với một số đích khác như yếu tố phát triển mà tác động đến sự phát triển của bệnh ung thư cụ thể. Theo cách khác hoặc ngoài ra, chế phẩm này còn có thể bao gồm chất hoá trị liệu, chất độc tế bào, xytokin, chất ức chế sự phát triển, chất kháng hormon và/hoặc chất bảo vệ tim mạch. Các phân tử này thích hợp có mặt kết hợp với lượng có hiệu quả đối với mục đích định trước.

Các thành phần hoạt tính cũng có thể được bẫy trong các vi nang được bào chế, ví dụ, bằng cách kỹ thuật giọt tụ hoặc bằng polyme hoá bề mặt phân giới, ví dụ, hydroxymetylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metylmethacylat), tương ứng, trong các hệ phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi khí albumin, vi nhũ hoá, hạt nano và các nang nano) hoặc nhũ hoá vĩ mô. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences 16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Các chế phẩm giải phóng duy trì có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về các chế phẩm giải phóng duy trì bao gồm các chất nền có thể bán thấm các polyme kỵ nước rắn chứa kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế, mà chất nền này là ở

dạng các vật phẩm tạo dáng, ví dụ, màng mỏng hoặc vi nang. Các ví dụ về các chất nền giải phóng duy trì bao gồm các polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyetyl-methacrylat), hoặc poly(rượu vinyl)), polylactit (Bằng Mỹ số 3,773,919), các copolyme của axit L-glutamic và γ etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không thoái biến, copolyme của axit lactic không thoái biến – axit glycolic như LUPRON DEPOT™ (các vi khí có thể tiêm bao gồm copolyme của axit lactic – axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric. Trong khi các polyme như etylen-vinyl axetat và axit lactic – axit glycolic có khả năng giải phóng các phân tử trong hơn 100 ngày, một số hydrogel giải phóng protein trong thời gian ngắn hơn. Khi các kháng thể được bao nang hoặc liên hợp miễn dịch duy trì trong cơ thể trong thời gian dài, chúng có thể làm biến tính hoặc kết tụ như là kết quả của việc tiếp xúc với hơi ẩm ở 37°C, dẫn đến mất hoạt tính sinh học và có khả năng thay đổi miễn dịch. Các chiến lược thích hợp có thể được dự định để làm ổn định hoá phụ thuộc cơ chế liên quan. Ví dụ, nếu cơ chế tích tụ được phát hiện là tạo thành gắn kết nội phân tử S-S thông qua sự trao đổi thio-disulfua, sự ổn định có thể đạt được bằng cách cải biến các gốc sulfhydryl, làm khô lạnh từ dung dịch axit, kiểm soát hàm lượng hơi ẩm, bằng cách sử dụng các chất phụ trợ thích hợp và phát triển các chế phẩm chất nền polyme đặc hiệu.

Kháng thể có thể được sản xuất ở dạng thích hợp để phân phát đến tế bào/mô đích. Ví dụ, kháng thể có thể được bào chế như liposom miễn dịch. "Liposom" là bình nhỏ bao gồm các loại lipit khác nhau, phospholipit và/hoặc chất hoạt động bề mặt mà là hữu ích để phân phát dược chất đến động vật có vú. Các hợp phần của liposom thường được sắp xếp ở dạng hai lớp, tương tự với sự sắp xếp lipit của màng sinh học. Các liposom chứa kháng thể được bào chế theo các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này, như được mô tả trong Epstein et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 82:3688 (1985); Hwang et al., *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 77:4030 (1980); các bằng Mỹ số 4,485,045 và 4,544,545; và WO97/38731 được công bố ngày 23/10/1997. Các liposom với thời gian lưu thông tăng cường được mô tả trong bằng Mỹ số 5,013,556.

Các liposom đặc biệt hữu ích được tạo ra bằng phương pháp bay hơi pha ngược với chế phẩm lipit bao gồm phosphatidylcholin, cholesterol và PEG-có dẫn xuất phosphatidyletanolamin (PEG-PE). Các liposom được đùn qua thiết bị lọc có kích thước lỗ được xác định để thu được liposom với đường kính mong muốn. Các mảnh

Fab của kháng thể theo sáng chế có thể được liên hợp với liposom như được mô tả trong Martin et al., *J. Biol. Chem.* 257:286-288 (1982) qua phản ứng trao đổi disulfua. Chất hoá trị liệu tuỳ ý được chứa trong liposom. Xem Gabizon et al., *J. National Cancer Inst.* 81(19):1484 (1989).

Chế phẩm sẽ được sử dụng để dùng in vivo phải là tiệt trùng. Điều này được hoàn thành bằng cách lọc qua màng lọc tiệt trùng.

H. Điều trị với kháng thể kháng CD79b

Để xác định sự biểu hiện của CD79b ở bệnh ung thư, các thử nghiệm phát hiện khác nhau là hiện có. Theo một phương án, sự biểu hiện CD79b polypeptit có thể được phân tích bằng hoá miễn dịch (IHC). Các phần mô được gắn vào parafin từ sinh thiết khối u có thể được cho vào thử nghiệm IHC và theo tiêu chuẩn cường độ nhuộm CD79b protein như sau:

Điểm 0 – không quan sát được nhuộm hoặc nhuộm màng được quan sát ở ít hơn 10% tế bào khối u

Điểm 1+ - nhuộm màng có thể nhận thấy yếu/không có được phát hiện ở nhiều hơn 10% tế bào khối u. Tế bào này chỉ được nhuộm trong một phần màng của chúng.

Điểm 2+ - nhuộm màng đầy đủ từ yếu đến trung bình được quan sát ở nhiều hơn 10% tế bào khối u.

Điểm 3+ - nhuộm màng đầy đủ từ trung bình đến mạnh được quan sát ở nhiều hơn 10% tế bào khối u.

Các khối u này với các điểm 0 hoặc 1+ để biểu hiện CD79b polypeptit có thể được đặc trưng như không biểu hiện quá mức CD79b, trong khi các khối u với các điểm 2+ hoặc 3+ có thể được đặc trưng như biểu hiện quá mức CD79b.

Theo cách khác hoặc ngoài ra, các thử nghiệm FISH như INFORM® (được bán bởi Ventana, Arizona) hoặc PATHVISION® (Vysis, Illinois) có thể được thực hiện trên mô khối u được cố định formalin, được gắn vào parafin để xác định mức (nếu có) biểu hiện quá mức CD79b ở khối u.

Sự biểu hiện quá mức hoặc khuếch đại CD79b có thể được đánh giá bằng cách sử dụng thử nghiệm phát hiện in vivo, ví dụ, bằng cách dùng phân tử (như kháng thể) mà gắn kết phân tử sẽ được phát hiện và được tạo đích với chất đánh dấu có thể phát hiện (ví dụ, chất đồng vị phóng xạ hoặc chất đánh dấu huỳnh quang) và sàng bên ngoài người bệnh để định vị chất đánh dấu.

Như được mô tả trên đây, kháng thể kháng CD79b theo sáng chế có các ứng dụng không điều trị khác nhau. Các kháng thể kháng CD79b theo sáng chế có thể là hữu ích để tạo giai đoạn bệnh ung thư biểu hiện CD79b polypeptit (ví dụ, trong tạo hình ảnh phóng xạ). Các kháng thể này cũng hữu ích để tinh chế hoặc kết tủa miễn dịch CD79b polypeptit từ tế bào, để phát hiện và định lượng CD79b polypeptit *in vitro*, ví dụ, trong ELISA hoặc giọt Tây, để giết chết và loại bỏ tế bào biểu hiện CD79b từ quần thể tế bào được tạo hỗn hợp như là bước trong tinh chế tế bào khác.

Hiện tại, phụ thuộc vào giai đoạn của bệnh ung thư, việc điều trị bệnh ung thư bao gồm một hoặc kết hợp các điều trị sau đây: phẫu thuật để loại bỏ mô ung thư, điều trị phóng xạ và hoá trị liệu. Điều trị kháng thể kháng CD79b có thể đặc biệt mong muốn ở người bệnh tuổi già mà không dung nạp độc tố và các tác dụng phụ của hoá trị liệu và ở bệnh di căn trong đó điều trị phóng xạ có tính hữu ích giới hạn. Các kháng thể kháng CD79b tạo đích khối u theo sáng chế là hữu ích để làm giảm bệnh ung thư biểu hiện CD79b ngay khi chẩn đoánh bệnh ban đầu hoặc trong thời gian tái phát. Để ứng dụng trong điều trị, kháng thể kháng CD79b có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp điều trị với, ví dụ, hormon, chất chống hình thành mạch hoặc các hợp chất được đánh dấu phóng xạ hoặc với phẫu thuật, điều trị cryo và/hoặc điều trị phóng xạ. Điều trị kháng thể kháng CD79b có thể được dùng kết hợp với các dạng điều trị thông thường khác, liên tiếp với, trước hoặc sau điều trị thông thường. Các dược chất hoá trị liệu như TAXOTERE® (docetaxel), TAXOL® (palictaxel), estramustin và mitoxantron được sử dụng trong điều trị bệnh ung thư, cụ thể là ở người bệnh có nguy cơ. Theo phương pháp hiện tại theo sáng chế để điều trị hoặc làm giảm bệnh ung thư, người bệnh mắc bệnh ung thư có thể được dùng kháng thể kháng CD79b kết hợp với điều trị với một hoặc nhiều chất hoá trị liệu trên đây. Cụ thể là, điều trị kết hợp với palictaxel và các dẫn xuất được cải biến (xem, ví dụ, EP0600517) là được đề xuất. kháng thể kháng CD79b sẽ được dùng với liều có hiệu quả điều trị của chất hoá trị liệu. Theo phương án khác, kháng thể kháng CD79b được dùng kết hợp với hoá trị liệu để làm tăng cường hoạt tính và hiệu quả của chất hoá trị liệu, ví dụ, paclitaxel. The Physicians' Desk Reference (PDR) mô tả các liều của chất này mà đã được sử dụng trong điều trị các bệnh ung thư khác nhau. Chế độ phân liều và liều của các dược chất hoá trị liệu được nêu trên đây là lượng có hiệu quả điều trị sẽ phụ thuộc vào bệnh ung

thư cụ thể sẽ được điều trị, mức độ bệnh và các yếu tố khác tương tự với bác sỹ trong lĩnh vực này và có thể được xác định bởi thầy thuốc.

Theo phương án cụ thể, thể liên hợp bao gồm kháng thể kháng CD79b được liên hợp với chất độc tế bào được dùng cho người bệnh. Tốt hơn là, liên hợp miễn dịch được gắn kết với CD79b protein được tiếp thu bởi tế bào, dẫn đến hiệu quả điều trị được gia tăng trong giết chết tế bào ung thư mà nó gắn kết. Theo phương án được ưu tiên, các đích của chất độc tế bào hoặc cản trở axit nucleic ở tế bào ung thư. Các ví dụ về các chất độc tế bào này được mô tả trên đây và bao gồm maytansinoit, calicheamixin, ribonucleaza và ADN endonucleaza.

Các kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp độc tố của chúng được dùng cho người bệnh, theo phương pháp đã biết như dùng trong tĩnh mạch, ví dụ, viên thuốc to hoặc bằng cách truyền liên tục trong thời gian dài, bằng đường trong bắp, trong màng bụng, trong tuỷ não, dưới da, trong khớp, trong hoạt dịch, trong vỏ, đường miệng, tại chỗ hoặc xông. Dùng kháng thể trong tĩnh mạch hoặc dưới da kháng thể là được ưu tiên.

Các chế độ điều trị khác có thể được kết hợp với dùng kháng thể kháng CD79b. Dùng kết hợp bao gồm cùng dùng, bằng cách sử dụng chế phẩm riêng rẽ hoặc dược phẩm đơn và dùng liên tiếp theo trình tự, trong đó tốt hơn là trong thời gian trong khi cả hai (hoặc tất cả) hoạt chất tạo ra các hoạt tính sinh học của chúng. Tốt hơn là, điều trị kết hợp dẫn đến hiệu quả điều trị hiệp đồng.

Cũng có thể mong muốn kết hợp dùng kháng thể hoặc các kháng thể kháng CD79b, với việc dùng kháng thể trực tiếp kháng kháng nguyên khối u khác liên quan đến bệnh ung thư cụ thể.

Theo phương án khác, phương pháp điều trị theo sáng chế bao gồm dùng kết hợp kháng thể (hoặc các kháng thể) kháng CD79b và một hoặc nhiều chất hoá trị liệu hoặc chất ức chế phát triển, bao gồm cùng dùng dịch chiết của các chất hoá trị liệu khác nhau hoặc (các) chất độc tế bào khác hoặc (các) chất hoá trị liệu khác mà cũng ức chế sự phát triển khối u. Các chất hoá trị liệu bao gồm estramustin phosphat, prednimustin, cisplatin, 5-flouraxil, melphalan, xyclophosphamit, hydroxyurea và hydroxyureataxan (như paclitaxel và doxetaxel) và/hoặc các chất kháng sinh anthraxyclin. Bào chế và chế độ phân liều đối với các chất hoá trị liệu này có thể được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc như được xác định theo kinh nghiệm

bởi chuyên gia trong lĩnh vực này. Bào chế và chế độ phân liều đối với hoá trị liệu này cũng được mô tả trong Chemotherapy Service Ed., M.C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, MD (1992). kháng thể này có thể được kết hợp với hợp chất kháng hormon; ví dụ hợp chất kháng estrogen như tamoxifen; kháng progesteron như onapriston (xem EP 616 812); hoặc kháng androgen như flutamit, các liều đã biết đối với các phân tử này. Trong đó bệnh ung thư sẽ được điều trị là bệnh ung thư độc lập androgen, người bệnh có thể được cho vào điều trị trước kháng androgen và sau đó bệnh ung thư trở nên độc lập androgen, kháng thể kháng CD79b (và tuỳ ý các chất khác như được mô tả ở đây) có thể được dùng cho người bệnh.

Đôi khi, có thể có lợi để cùng dùng chất bảo vệ tim mạch (để ngăn ngừa hoặc giảm rối loạn chức năng tim mạch liên quan đến điều trị) hoặc một hoặc nhiều xytokin cho người bệnh. Ngoài chế độ điều trị trên đây, người bệnh có thể được cho vào phẫu thuật loại bỏ tế bào ung thư và/hoặc điều trị phóng xạ (ví dụ chiếu xạ bên ngoài hoặc điều trị với chất đánh dấu phóng xạ, như kháng thể), trước, đồng thời với, hoặc sau điều trị kháng thể. Các liều thích hợp đối với các chất được cùng dùng trên đây là các liều hiện được sử dụng và có thể được giảm do tác dụng kết hợp (hiệp đồng) của chất này và kháng thể kháng CD79b.

Chế phẩm kháng thể theo sáng chế sẽ được bào chế, phân liều và được dùng ở dạng thích hợp với thực tiễn y tế. Các yếu tố để xem xét theo sáng chế bao gồm rối loạn cụ thể sẽ được điều trị, động vật có vú cụ thể sẽ được điều trị, tình trạng bệnh lâm sàng của cá thể người bệnh, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí phân phát chất, phương pháp dùng, chế độ dùng và các yếu tố khác đã biết đối với bác sỹ y khoa. kháng thể này không cần, nhưng tuỳ ý được bào chế với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn cần thiết. Lượng có hiệu quả của chất khác phụ thuộc vào kháng thể theo sáng chế có mặt trong chế phẩm, kiểu rối loạn hoặc điều trị và các yếu tố khác được mô tả trên đây. Thường được sử dụng trong các liều giống nhau và với đường dùng như được sử dụng trên đây hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều được dùng trước đây.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều và phương thức dùng sẽ được chọn bởi bác sỹ theo các tiêu chuẩn đã biết. Liều kháng thể thích hợp sẽ phụ thuộc vào loại bệnh sẽ được điều trị, như được xác định trên đây, tính nguy kịch và tiến trình bệnh, nếu kháng thể được dùng cho mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị, điều trị trước, lịch sử lâm

sàng của người bệnh và đáp ứng với kháng thể và theo ý muốn của bác sỹ điều trị. kháng thể thích hợp được dùng cho người bệnh một lần hoặc trong nhiều lần điều trị. Tốt hơn là, kháng thể được dùng bằng cách tiêm truyền tĩnh mạch hoặc bằng cách tiêm dưới da. Phụ thuộc vào kiểu và tính nguy kịch của bệnh, khoảng từ 1μg/kg đến 50mg/kg thể trọng (ví dụ, khoảng từ 0,1-15mg/kg/liều) kháng thể có thể là liều quan tâm khởi đầu để dùng cho người bệnh, nếu, ví dụ, bởi một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ hoặc tiêm truyền liên tục. Chế độ phân liều có thể bao gồm dùng liều khởi đầu khoảng 4mg/kg, tiếp theo bởi liều duy trì hàng tuần khoảng 2mg/kg kháng thể kháng CD79b. Tuy nhiên, các chế độ liều khác có thể là hữu ích. Liều hàng ngày thông thường có thể nằm trong khoảng từ 1μg/kg đến 100mg/kg hoặc lớn hơn, phụ thuộc vào các yếu tố được nêu trên đây. Để dùng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị được duy trì cho đến khi ngăn chặn triệu chứng bệnh mong muốn xảy ra. Sự tiến triển của điều trị này có thể được kiểm soát dễ dàng bằng các phương pháp và thử nghiệm thông thường và dựa trên các tiêu chuẩn đã biết đối với bác sỹ hoặc chuyên gia trong lĩnh vực này.

Ngoài việc dùng protein kháng thể cho người bệnh, sáng chế nhằm mục đích dùng kháng thể theo cách điều trị gen. Việc dùng axit nucleic mã hoá kháng thể được bao gồm bởi sự biểu hiện "dùng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể". Xem, ví dụ, WO96/07321 được công bố ngày 14/3/1996 đề cập đến việc sử dụng điều trị gen để sinh ra kháng thể nội bào.

Có hai phương pháp chính để đưa axit nucleic (tuỳ ý được chứa trong vectơ) vào tế bào của người bệnh; in vivo và *ex vivo*. Để phân phát in vivo axit nucleic được tiêm trực tiếp vào người bệnh, thường là ở vị trí trong đó kháng thể cần thiết. Để điều trị *ex vivo*, các tế bào của người bệnh là được loại bỏ, axit nucleic được đưa vào tế bào được phân lập và tế bào được cải biến được dùng cho người bệnh trước trực tiếp hoặc, ví dụ, được bao nang trong màng rỗng mà được cấy vào người bệnh (xem, ví dụ các bằng Mỹ số 4,892,538 và 5,283,187). Có nhiều kỹ thuật là hiện có để đưa axit nucleic vào các tế bào có thể sống. Các kỹ thuật này thay đổi phụ thuộc vào nếu axit nucleic được chuyển nhiễm vào tế bào được nuôi cấy *in vitro*, hoặc in vivo vào tế bào chủ quan tâm. Các kỹ thuật thích hợp để chuyển axit nucleic vào tế bào động vật có vú *in vitro* bao gồm sử dụng liposom, bắn điện, vi tiêm, dung hợp tế bào, DEAE-dextran,

phương pháp kết tủa canxi phosphat, v.v..Vectơ thường được sử dụng để phân phát gen *ex vivo* là vectơ retrovirút.

Các kỹ thuật chuyển axit nucleic in vivo hiện được ưu tiên bao gồm chuyển nhiễm với vectơ vi rút (như adenovirút, Herpes simplex I virút hoặc adeno-liên quan đến virút) và các hệ dựa trên lipit (các lipit hữu ích để chuyển gen qua trung gian lipit là DOTMA, DOPE và DC-Chol, chẳng hạn). Để xem xét gen hiện tại đã biết và phương pháp điều trị gen xem Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Cũng xem WO 93/25673 và các tài liệu được trích dẫn ở đây.

Các kháng thể kháng CD79b theo sáng chế có thể ở dạng khác nhau được bao gồm bởi định nghĩa "kháng thể" ở đây. Do đó, kháng thể bao gồm toàn bộ chiều dài kháng thể hoặc kháng thể nguyên vẹn, mảnh kháng thể, kháng thể trình tự nguyên gốc hoặc biến thể axit amin, kháng thể được làm thích hợp với người, khảm hoặc dung hợp, liên hợp miễn dịch và các mảnh chức năng của chúng. Các kháng thể dung hợp trình tự kháng thể được dung hợp với trình tự polypeptit khác nhau. Các kháng thể này có thể được cải biến ở vùng Fc để tạo ra các chức năng phản ứng kích thích mong muốn. Như được mô tả chi tiết hơn trong các phần ở đây, với các vùng Fc thích hợp, kháng thể trần được gắn kết trên bề mặt tế bào có thể cảm biến độc tố, ví dụ, qua độc tố tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC) hoặc bằng cách chọn lọc hợp phần trong độc tố tế bào phụ thuộc hợp phần hoặc một số cơ chế khác. Theo cách khác, mong muốn để loại bỏ hoặc làm giảm chức năng phản ứng kích thích, sao cho giảm thiểu tác dụng phụ hoặc các biến chứng điều trị, một số vùng Fc khác có thể được sử dụng.

Theo một phương án, kháng thể này cạnh tranh để gắn kết hoặc về căn bản là gắn kết với, epitop giống như kháng thể theo sáng chế. kháng thể có các đặc trưng sinh học của kháng thể kháng CD79b ban đầu theo sáng chế cũng được đề xuất, đặc biệt là bao gồm tạo đích khối u in vivo và ức chế tăng sinh tế bào bất kỳ hoặc các đặc tính độc tố tế bào.

Các phương pháp sản xuất kháng thể trên đây được mô tả chi tiết ở đây.

Các kháng thể kháng CD79b là hữu ích để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD79b hoặc làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh ung thư ở động vật có vú. Bệnh ung thư bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, ung thư tế bào tạo huyết hoặc ung thư liên quan đến máu như, u lympho, bệnh bạch cầu, u tuỷ hoặc các khối u ắc tính tế bào bạch huyết, nhưng cả các bệnh ung thư lá lách và ung thư hạch bạch huyết.

Các ví dụ cụ thể hơn về các bệnh ung thư liên quan đến tế bào B, bao gồm ví dụ, u lympho ở mức cao, trung bình và thấp (bao gồm u lympho tế bào B như, ví dụ, u lympho tế bào B mô bạch huyết liên quan đến màng nhày và u lympho không Hodgkin, u lympho tế bào vỏ, u lympho Burkitt, u lympho bạch cầu nhỏ, u lympho vùng bên, u lympho tế bào lớn khuếch tán, u lympho dạng nang và u lympho Hodgkin và u lympho tế bào T) và bệnh bạch cầu (bao gồm bệnh bạch cầu thứ cấp, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính, như bệnh bạch cầu tế bào B (tế bào bạch huyết CD5+ B), bệnh bạch cầu u tuỷ, như bệnh bạch cầu u tuỷ cấp tính, bệnh bạch cầu u tuỷ mạn tính, bệnh bạch cầu tế bào lympho, như bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính và loạn sản u tuỷ) và bệnh ung thư liên quan đến tế bào tạo huyết và/hoặc tế bào B hoặc tế bào T. Bệnh ung thư bao gồm ung thư di căn bất kỳ trên đây. kháng thể có khả năng gắn kết với ít nhất là một phần của tế bào ung thư mà biểu hiện CD79b polypeptit ở động vật có vú. Theo phương án được ưu tiên, kháng thể có hiệu quả phá huỷ hoặc giết chết tế bào khối u biểu hiện CD79b hoặc ức chế sự phát triển của tế bào khối u, *in vitro* hoặc in vivo, ngay khi gắn kết với CD79b polypeptit trên tế bào. kháng thể bao gồm kháng thể trần kháng CD79b (không được liên hợp với chất bất kỳ). Các kháng thể trần có độc tố tế bào hoặc các đặc tính ức chế sự phát triển tế bào còn có thể được khai thác với chất độc tế bào để tạo cho chúng hiệu lực hơn trong việc phá vỡ tế bào khối u. Các đặc tính độc tố tế bào có thể được tạo ra với kháng thể kháng CD79b bởi, ví dụ liên hợp kháng thể với chất độc tế bào, để tạo thành liên hợp miễn dịch như được mô tả ở đây. Chất độc tế bào hoặc chất ức chế sự phát triển tốt hơn là phân tử nhỏ. Các độc tố như calicheamixin hoặc maytansinoit và chất tương tự hoặc các dẫn xuất của chúng, là được ưu tiên.

Sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể kháng CD79b theo sáng chế và chất mang. Đối với mục đích điều trị bệnh ung thư, các chế phẩm có thể được dùng cho người bệnh cần điều trị này, trong đó chế phẩm này bao gồm một hoặc nhiều kháng thể kháng CD79b có mặt như liên hợp miễn dịch hoặc như kháng thể trần. Theo phương án khác, các chế phẩm có thể bao gồm các kháng thể này kết hợp với các chất điều trị khác như chất độc tế bào hoặc chất ức chế sự phát triển, bao gồm các chất hoá trị liệu. Sáng chế cũng đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể kháng CD79b theo sáng chế và chất mang. Theo một phương án, chế phẩm là chế phẩm điều trị bao gồm chất mang dược dụng.

Khía cạnh khác của sáng chế là các axit nucleic được phân lập mã hoá kháng thể kháng CD79b. Các axit nucleic mã hoá các chuỗi H và L và đặc biệt là các gốc vùng siêu biến, chuỗi mà mã hoá kháng thể trình tự nguyên gốc cũng như các biến thể, cải biến và các phiên bản kháng thể được làm thích hợp với người, là được bao gồm.

Sáng chế cũng đề xuất phương pháp hữu ích để điều trị bệnh ung thư biểu hiện CD79b polypeptit hoặc làm chậm một hoặc nhiều triệu chứng của bệnh ung thư ở động vật có vú, bao gồm cho động vật có vú dùng lượng có hiệu quả điều trị của kháng thể kháng CD79b. Các chế phẩm điều trị kháng thể có thể được dùng trong thời gian ngắn (cấp tính) hoặc mạn tính hoặc gián đoạn theo hướng dẫn của bác sỹ. Cũng được đề xuất là các phương pháp ức chế sự phát triển và giết chết tế bào biểu hiện CD79b polypeptit.

Sáng chế cũng đề xuất kit và vật phẩm sản xuất bao gồm ít nhất là một kháng thể kháng CD79b. Các kit chứa các kháng thể kháng CD79b sử dụng, ví dụ thử nghiệm giết chết tế bào CD79b, để tinh chế hoặc kết tủa miễn dịch CD79b polypeptit từ tế bào. Ví dụ, để phân lập và tinh chế CD79b, kit có thể chứa kháng thể kháng CD79b được cặp đôi với hạt (ví dụ, hạt sepharoza). Các kit có thể được tạo ra mà chứa các kháng thể để phát hiện và định lượng CD79b *in vitro*, ví dụ trong ELISA hoặc giọt Tây. kháng thể này là hữu ích để phát hiện có thể được tạo ra với chất đánh dấu như huỳnh quang hoặc đánh dấu phóng xạ.

I. Điều trị thể liên hợp kháng thể-dược chất

Đã được dự định rằng các thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) theo sáng chế có thể được sử dụng để điều trị các bệnh hoặc các rối loạn khác nhau, ví dụ được đặc trưng bởi sự biểu hiện quá mức của kháng nguyên khối u. Các tình trạng bệnh hoặc các rối loạn tăng sinh tế bào quá mức ví dụ bao gồm các khối u lành tính hoặc ắc tính; bệnh bạch cầu và u lympho ắc tính. Các bệnh khác bao gồm bệnh thần kinh, tế bào thần kinh đệm, tế bào hình sao, dưới đồi, tuyến, đại thực bào, biểu mô, chất đệm nền, khoang phổi, viêm, sự hình thành mạch và miễn dịch, bao gồm tự miễn, các rối loạn.

Các hợp chất ADC mà được xác định ở các mô hình động vật và thử nghiệm trên tế bào còn có thể được thử nghiệm ở các thử nghiệm lâm sàng động vật linh trưởng bậc cao và con người mang khối u. Các thử nghiệm lâm sàng ở người có thể được dự định để thử nghiệm hiệu quả của kháng thể đơn dòng kháng CD79b hoặc liên

hợp miễn dịch theo sáng chế ở người bệnh đang thử nghiệm rối loạn tăng sinh tế bào B bao gồm không giới hạn đến u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm chiếm, NHL xâm chiếm tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và bệnh bạch cầu tế bào vỏ. Thử nghiệm lâm sàng có thể được xác định để đánh giá hiệu quả của ADC kết hợp với các chế độ điều trị đã biết, như phóng xạ và/hoặc hoá trị liệu bao gồm các chất hoá trị liệu đã biết và/hoặc độc tố tế bào.

Thông thường, bệnh hoặc rối loạn sẽ được điều trị là bệnh tăng sinh tế bào quá mức như rối loạn tăng sinh tế bào B và/hoặc ung thư tế bào B. Các ví dụ về bệnh ung thư sẽ được điều trị bao gồm nhưng không chỉ giới hạn đến, rối loạn tăng sinh tế bào B được chọn từ u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm chiếm, NHL xâm chiếm tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và bệnh bạch cầu tế bào vỏ.

Bệnh ung thư có thể bao gồm các tế bào biểu hiện CD79b, sao cho ADC theo sáng chế có khả năng gắn kết với tế bào ung thư. Để xác định sự biểu hiện CD79b ở bệnh ung thư, các thử nghiệm chẩn đoán/tiên lượng khác nhau là hiện có. Theo một phương án, sự biểu hiện quá mức CD79b có thể được phân tích bởi IHC. Các phần mô được gắn vào parafin từ sinh thiết khối u có thể được cho vào thử nghiệm IHC và thích hợp với các tiêu chuẩn cường độ nhuộm CD79b protein với mức nhuộm và tỷ lệ của các tế bào khối u được thử nghiệm.

Để ngăn ngừa và điều trị bệnh, liều thích hợp của ADC sẽ phụ thuộc vào bệnh sẽ được điều trị, như được xác định trên đây, tính nguy kịch và tiến trình bệnh, phân tử được dùng cho mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị, điều trị trước, lịch sử lâm sàng của người bệnh và đáp ứng với kháng thể và theo ý muốn của bác sỹ. Phân tử được dùng thích hợp cho người bệnh một lần hoặc trong nhiều lần điều trị. Phụ thuộc vào loại và tính nguy kịch của bệnh, khoảng từ 1µg/kg đến 15mg/kg (ví dụ 0,1-20mg/kg) phân tử là liều ban đầu để dùng cho người bệnh, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục. Liều hàng ngày thường có thể nằm trong khoảng

từ 1μg/kg đến 100mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các yếu tố được nêu trên đây. Liều mẫu của ADC sẽ được dùng cho người bệnh nằm trong khoảng từ 0,1 đến 10mg/kg khối lượng người bệnh.

Để dùng nhắc lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh, điều trị là duy trì cho đến khi ngăn chặn mong muốn các triệu chứng bệnh xảy ra. Chế độ phân liều mẫu bao gồm dùng liều lượng ban đầu khoảng 4mg/kg, tiếp theo bởi liều duy trì hàng tuần là khoảng 2mg/kg kháng thể kháng ErbB2. Các chế độ liều khác có thể là hữu ích. Quy trình điều trị này là được kiểm tra dễ dàng bằng các kỹ thuật hoặc thử nghiệm thông thường.

J. Điều trị kết hợp

Thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) theo sáng chế có thể được kết hợp với dược phẩm hoặc chế độ liều như điều trị kết hợp, với hợp chất thứ hai có các đặc tính chống bệnh ung thư. Hợp chất thứ hai của dược phẩm hoặc chế độ phân liều tốt hơn là có các hoạt tính bổ sung cho ADC của chế phẩm sao cho chúng không có tác dụng ngược với nhau.

Hợp chất thứ hai có thể là chất hoá trị liệu, chất độc tế bào, xytokin, chất kháng hormon và/hoặc chất bảo vệ tim. Các phân tử này là thích hợp có mặt trong chế phẩm với lượng mà có hiệu quả cho mục đích định trước. Dược phẩm chứa ADC theo sáng chế cũng có thể có lượng có hiệu quả điều trị của chất hoá trị liệu như chất ức chế tạo tubulin, chất ức chế topoisomeraza hoặc chất gắn kết ADN.

Theo một khía cạnh, hợp chất thứ nhất là ADC kháng CD79b theo sáng chế và hợp chất thứ hai là kháng thể kháng CD20 (kháng thể trần hoặc ADC). Theo một phương án, hợp chất thứ hai là kháng thể kháng CD20 rituximab (Rituxan®) hoặc 2H7 (Genentech, Inc., South San Francisco, CA). Các kháng thể khác hữu ích để điều trị miễn dịch kết hợp với các ADC kháng CD79b theo sáng chế bao gồm nhưng không giới hạn, kháng VEGF (ví dụ, Avastin®).

Các chế độ điều trị khác có thể kết hợp với việc dùng chất chống ung thư được xác định theo sáng chế, bao gồm nhưng không giới hạn điều trị phóng xạ và/hoặc tuỷ xương và cấy ghép máu ngoại vi và/hoặc chất độc tế bào, chất hoá trị liệu, hoặc chất ức chế sự phát triển. Trong một trong số các phương án này, chất hoá trị liệu là chất hoặc kết hợp các chất như, ví dụ, xyclophosphamit, hydroxydaunorubixin, adriamyxin,

doxorubixin, vincristin (Oncovin™), prednisolon, CHOP, CVP, hoặc COP, hoặc điều trị miễn dịch như kháng CD20 (ví dụ, Herceptin®) hoặc kháng VEGF (ví dụ, Avastin®).

Điều trị kết hợp có thể được dùng như chế độ đồng thời hoặc theo thứ tự. Khi được dùng theo thứ tự, chế phẩm có thể được dùng hai hoặc nhiều lần dùng. Dùng kết hợp bao gồm cùng dùng, bằng cách sử dụng các chế phẩm riêng rẽ hoặc dược phẩm đơn và dùng liên tiếp theo thứ tự, trong đó tốt hơn là trong thời gian trong khi cả hai (hoặc tất cả) hoạt chất áp dụng đồng thời các hoạt tính sinh học của chúng

Theo một phương án, điều trị với ADC bao gồm dùng kết hợp chất chống ung thư được xác định ở đây và một hoặc nhiều chất hoá trị liệu hoặc chất ức chế phát triển, bao gồm cùng dùng các các hỗn hợp gồm các chất hoá trị liệu khác nhau. Các chất hoá trị liệu bao gồm taxan (như paclitaxel và doxetaxel) và/hoặc các chất kháng sinh anthraxyclin. Bào chế và chế độ phân liều đối với các chất hoá trị liệu này có thể được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất hoặc được xác định theo kinh nghiệm của bác sỹ chuyên khoa. Bào chế và chế độ phân liều đối với hoá trị liệu này cũng đã được mô tả trong "Chemotherapy Service", (1992) Ed., M. C. Perry, Williams & Wilkins, Baltimore, Md.

Các liều thích hợp của các chất cùng dùng bất kỳ trên đây là các liều hiện được sử dụng và có thể giảm do tác dụng kết hợp (hiệp đồng) các chất được xác định mới này và các chất hoá trị liệu khác hoặc điều trị khác.

Điều trị kết hợp có thể tạo ra "tính hiệp đồng" và chứng minh "tính hiệp đồng", nghĩa là hiệu quả đạt được khi các thành phần hoạt tính được sử dụng cùng nhau là lớn hơn so với tổng hiệu quả mà các kết quả từ việc sử dụng các hợp chất riêng rẽ. Hiệu quả hiệp đồng có thể đạt được khi các thành phần hoạt tính là: (1) cùng được bào chế và được dùng hoặc được phân phát đồng thời trong chế phẩm kết hợp, liều đơn vị; (2) được phân phát bởi sự khác nhau hoặc song song như các chế phẩm riêng rẽ; hoặc (3) bằng một số chế độ khác. Khi được phân phát trong điều trị khác nhau, hiệu quả hiệp đồng có thể đạt được khi các hợp chất được dùng hoặc được phân phát theo trình tự, ví dụ bởi các lần tiêm truyền khác nhau trong ống thuốc tiêm riêng rẽ. Thông thường, trong điều trị khác nhau, liều có hiệu quả của mỗi thành phần hoạt tính được dùng theo

trình tự, nghĩa là theo thứ tự, trong khi đó trong điều trị kết hợp, liều có hiệu quả của hai hoặc nhiều thành phần hoạt tính được dùng cùng với nhau.

K. Vật phẩm sản xuất và kit

Theo phương án khác theo sáng chế, vật phẩm sản xuất chứa các nguyên liệu hữu ích để điều trị bệnh, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán bệnh ung thư biểu hiện CD79b. Vật phẩm sản xuất bao gồm vật chứa và đánh dấu hoặc gói chèn vào trên hoặc kết hợp với vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ nhỏ, ống thuốc tiêm, gói bao bì, v.v.. Các vật chứa có thể được tạo thành từ nhiều nguyên liệu như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa giữ chế phẩm mà có hiệu quả để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh ung thư và có thể có cửa vào ra tiệt trùng (ví dụ vật chứa có thể là túi dung dịch tiêm tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nắp có thể xuyên qua bởi kim tiêm dưới da). Ít nhất là một hoạt chất trong chế phẩm là kháng thể kháng CD79b theo sáng chế. Đánh dấu hoặc gói chèn vào cho biết chế phẩm được sử dụng để điều trị người bệnh mắc bệnh ung thư. Theo cách khác, vật phẩm sản xuất còn có thể bao gồm vật chứa thứ hai bao gồm chất đệm dược dụng, như nước kìm hãm vi khuẩn để tiêm (BWFl), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Còn có thể bao gồm các nguyên liệu khác mong muốn từ thị trường và theo quan điểm của người sử dụng, bao gồm chất đệm, chất pha loãng, chất lọc, kim tiêm và ống thuốc tiêm.

Kit cũng được đề xuất là hữu ích cho các mục đích khác nhau, ví dụ, cho thử nghiệm giết chết tế bào biểu hiện CD79b, để tinh chế hoặc kết tủa miễn dịch của CD79b polypeptit từ tế bào. Để phân lập và tinh chế CD79b polypeptit, kit này có thể chứa kháng thể kháng CD79b được cặp đôi với hạt (ví dụ, hạt sepharoza). Kit có thể được tạo ra mà chứa các kháng thể để phát hiện và định lượng CD79b polypeptit *in vitro*, ví dụ, trong ELISA hoặc giọt Tây. Với vật phẩm sản xuất, kit bao gồm vật chứa và chất đánh dấu hoặc gói chèn vào hoặc kết hợp với vật chứa này. Vật chứa này giữ chế phẩm bao gồm ít nhất là một kháng thể kháng CD79b theo sáng chế. Các vật chứa bổ sung có thể được bao gồm mà chứa, ví dụ các chất pha loãng và chất đệm, kháng thể đối chứng. Chất đánh dấu hoặc gói chèn vào có thể tạo ra sự mô tả chế phẩm cũng như các hướng dẫn nhằm mục đích sử dụng in vitro hoặc phát hiện.

L. Sử dụng CD79b Polypeptit

Sáng chế bao gồm các phương pháp sàng các hợp chất để nhận biết CD79b polypeptit mô phỏng (chất chủ vận) hoặc ngăn ngừa hiệu quả CD79b polypeptit (chất đối kháng). Các thử nghiệm sàng đối với dược chất đối kháng quan tâm được ký hiệu

để nhận biết các hợp chất mà gắn kết hoặc tạo phức với các CD79b polypeptit được mã hóa bởi các gen được xác định ở đây, hoặc mặt khác cản trở sự tương tác của các polypeptit được mã hoá với các protein tế bào khác, bao gồm ví dụ, ức chế sự biểu hiện của CD79b polypeptit từ tế bào. Các thử nghiệm sàng này sẽ bao gồm các thử nghiệm có thể sửa đổi thích hợp để sàng các thư viện hóa học với lượng lớn, làm cho chúng tốt hơn là thích hợp để nhận biết dược chất phân tử nhỏ.

Các thử nghiệm này được thực hiện ở nhiều dạng, bao gồm thử nghiệm gắn kết protein-protein, thử nghiệm sàng sinh hóa, thử nghiệm miễn dịch và các thử nghiệm dựa trên tế bào, mà được đặc trưng trong lĩnh vực này.

Tất cả các thử nghiệm đối với chất đối kháng thường cần thiết để cho dược chất quan tâm tiếp xúc với CD79b polypeptit được mã hóa bởi axit nucleic được xác định ở đây dưới các điều kiện và trong thời gian đủ để cho phép hai hợp phần này tương tác.

Trong thử nghiệm gắn kết, sự tương tác là gắn kết và phức được tạo thành có thể được phân lập hoặc phát hiện trong hỗn hợp phản ứng. Theo phương án cụ thể, CD79b polypeptit được mã hóa bởi gen được xác định ở đây hoặc dược chất quan tâm được cố định trên pha rắn, *ví dụ*, trên đĩa vi chuẩn, bằng các gắn kết cộng hóa trị hoặc không cùng hóa trị. Gắn kết không cộng hóa trị thường được kết thúc bằng cách bao ngoài bề mặt rắn với dung dịch chứa CD79b polypeptit và làm khô. Theo cách khác, kháng thể được làm cố định, *ví dụ*, kháng thể đơn dòng, đặc hiệu đối với CD79b polypeptit sẽ được cố định có thể được sử dụng để neo nó vào bề mặt rắn. Thử nghiệm này được thực hiện bằng cách bổ sung hợp phần không được cố định, mà có thể được đánh dấu bằng chất đánh dấu có thể phát hiện, với hợp phần được cố định, *ví dụ*, bề mặt được bao ngoài chứa hợp phần được neo. Khi phản ứng kết thúc, các hợp phần không được phản ứng được loại bỏ, *ví dụ*, bằng cách rửa và các phức được neo trên bề mặt rắn được phát hiện. Khi hợp phần không được tạo cố định ban đầu mang đánh dấu có thể phát hiện, việc phát hiện đánh dấu được cố định trên bề mặt cho biết rằng việc tạo phức đã xảy ra. Khi hợp phần không được tạo cố định ban đầu không mang đánh dấu, việc tạo phức có thể được phát hiện, ví dụ, bằng cách sử dụng kháng thể được đánh dấu gắn kết đặc hiệu phức được làm cố định.

Nếu hợp chất quan tâm tương tác với nhưng không gắn kết với CD79b polypeptit cụ thể được mã hóa bởi gen được xác định ở đây, sự tương tác của nó với polypeptit có thể được thử nghiệm bằng các phương pháp đã biết để phát hiện các

tương tác protein-protein. Các thử nghiệm này bao gồm các phương pháp truyền thống, như, *ví dụ*, liên kết ngang, cùng tạo kết tủa miễn dịch và cùng tinh chế qua gradient hoặc cột sắc ký. Ngoài ra, các tương tác protein-protein có thể được kiểm tra bằng cách sử dụng hệ di truyền dựa trên nấm men bởi Fields và cộng sự (Fields and Song, Nature (London), 340:245-246 [1989]); Chien *et al.*, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 88:9578-9582 [1991]) như được mô tả bởi Chevray and Nathans, Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 89:5789-5793 (1991). Nhiều chất hoạt hóa sao chép, như nấm men GAL4, bao gồm hai miền điều biến rời rạc về mặt vật lý, một hoạt động như miền gắn kết ADN, miền khác có chức năng như miền hoạt hóa sao chép. Hệ biểu hiện nấm men được mô tả trong các công bố trên đây (thường được gọi là "hệ lai kép") tạo ra thuận lợi của đặc tính này và dùng hai protein lai, một là trong đó protein đích được dung hợp với miền gắn kết ADN của GAL4, và còn lại, trong đó protein hoạt hóa quan tâm như được dung hợp với miền hoạt hóa. Sự biểu hiện của gen thông báo GAL1-*lacZ* dưới sự kiểm soát của đoạn khởi đầu hoạt hóa GAL4 phụ thuộc vào việc tạo cấu trúc lại hoạt tính GAL4 qua tương tác protein-protein. Các khuẩn lạc chứa các polypeptit tương tác được phát hiện với chất nền chromogenic đối với β-galactosidaza. Kit hoàn toàn (MATCHMAKER™) để nhận biết các tương tác protein-protein giữa hai protein đặc hiệu bằng cách sử dụng kỹ thuật lai kép hiện có bán trên thị trường từ Clontech. Hệ này cũng có thể được mở rộng để tạo bản đồ miền protein liên quan đến các tương tác protein đặc hiệu cũng như định vị các gốc axit amin mà quyết định đối với các tương tác này.

Các hợp chất mà cản trở sự tương tác của gen mã hóa CD79b polypeptit được xác định ở đây và các hợp phần nội bào hoặc ngoại bào khác có thể được thử nghiệm như sau: hỗn hợp phản ứng thường được điều chế chứa sản phẩm gen và hợp phần nội bào hoặc ngoại bào dưới các điều kiện và trong thời gian cho phép tương tác và gắn kết hai sản phẩm này. Để thử nghiệm khả năng của hợp chất quan tâm để ức chế gắn kết, phản ứng được thực hiện với sự không có mặt và với sự có mặt của hợp chất thử nghiệm. Ngoài ra, giả thuốc có thể được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng thứ ba, để làm đối chứng dương. Sự gắn kết (tạo phức) giữa hợp chất thử nghiệm này và hợp phần nội bào hoặc ngoại bào có mặt trong hỗn hợp được kiểm tra như được mô tả ở đây trên đây. Việc tạo thành phức trong (các) phản ứng đối chứng nhưng không trong hỗn hợp

phản ứng chứa hợp chất thử nghiệm cho biết rằng hợp chất thử nghiệm cản trở với sự tương tác của hợp chất thử nghiệm và hợp phần phản ứng của nó.

Để thử nghiệm đối với chất đối kháng, CD79b polypeptit có thể được bổ sung vào tế bào cùng với hợp chất sẽ được sàng đối với hoạt tính và khả năng cụ thể của hợp chất để ức chế hoạt tính quan tâm với sự có mặt của CD79b polypeptit cho biết hợp chất là chất đối kháng với CD79b polypeptit. Theo cách khác, chất đối kháng có thể được phát hiện bằng cách kết hợp CD79b polypeptit và chất đối kháng tiềm năng với các thụ thể CD79b polypeptit gắn kết màng hoặc các thụ thể tái tổ hợp dưới các điều kiện thích hợp đối với thử nghiệm ức chế cạnh tranh. CD79b polypeptit có thể được đánh dấu, như bằng cách hoạt tính phóng xạ, sao cho số lượng phân tử CD79b polypeptit được gắn kết với thụ thể có thể được sử dụng để xác định hiệu quả của chất đối kháng tiềm năng. Gen mã hóa thụ thể có thể được nhận biết bằng nhiều phương pháp đã biết đối với chuyên gia trong lĩnh vực này, ví dụ, quay phối tử và sắp xếp FACS. Coligan *et al*., Current Protocols in Immun., 1(2): Chapter 5 (1991). Tốt hơn là, thể đơn dòng biểu hiện được dùng trong đó ARN được polyadenyl hóa được điều chế từ tế bào đáp ứng với CD79b polypeptit và thư viện ADN bổ trợ được tạo ra từ ARN này được phân chia thành các bể và được sử dụng để chuyển nhiễm các tế bào COS hoặc các tế bào khác mà không đáp ứng với CD79b polypeptit. Các tế bào được chuyển nhiễm được phát triển trên các tấm thủy tinh được tiếp xúc với CD79b polypeptit được đánh dấu. CD79b polypeptit có thể được đánh dấu theo nhiều phương pháp bao gồm iot hóa hoặc bao gồm vị trí nhận biết đối với vị trí protein kinaza đặc hiệu. Việc cố định và ủ sau đây, tấm kính được cho vào phân tích tự chụp bằng tia X. Các bể dương được nhận biết và các bể phụ được chuẩn bị và được chuyển nhiễm lại bằng cách sử dụng bể phụ tương tác và các quy trình sàng lại, cuối cùng thu được thể đơn dòng đơn mà mã hóa thụ thể giả định.

Như phương pháp khác để nhận biết thụ thể, CD79b polypeptit được đánh dấu có thể được liên kết ái lực ánh sáng với màng tế bào hoặc các chế phẩm ngoại bào mà biểu hiện phân tử thụ thể. Nguyên liệu liên kết ngang được hòa tan bởi PAGE và được cho tiếp xúc với màng tia X. Phức được đánh dấu chứa thụ thể này được cắt bỏ, được hòa tan vào các mảnh peptit và được cho vào tạo vi trình tự protein. Trình tự axit amin thu được từ việc tạo vi trình tự có thể được sử dụng để ký hiệu bộ dò oligonucleotit thoái biến để sàng thư viện ADN bổ trợ để nhận biết gen mã hóa thụ thể giả định.

Trong thử nghiệm khác đối với chất đối kháng, các tế bào động vật có vú hoặc chế phẩm màng biểu hiện thụ thể có thể được ủ với CD79b polypeptit được đánh dấu với sự có mặt của hợp chất quan tâm. Khả năng của hợp chất để làm tăng cường hoặc phong bế tương tác này sau đó có thể được xác định.

Các ví dụ cụ thể hơn về chất đối kháng tiềm năng bao gồm oligonucleotit mà gắn kết với các dung hợp của globulin miễn dịch với CD79b polypeptit, và, cụ thể là, các kháng thể bao gồm, mà không giới hạn, các kháng thể đa dòng và đơn dòng và mảnh kháng thể, các kháng thể chuỗi đơn, các kháng thể kháng idiotyp và các version khảm hoặc được nhân hóa của các kháng thể hoặc mảnh này, cũng như các kháng thể của người và mảnh kháng thể. Theo cách khác, chất đối kháng tiềm năng có thể là protein liên quan gần nhất, ví dụ, dạng đột biến của CD79b polypeptit mà nhận biết thụ thể nhưng tác động không hiệu quả, nhờ đó ức chế cạnh tranh sự hoạt động của CD79 polypeptit.

Các kháng thể gắn kết đặc hiệu CD79b polypeptit được xác định ở đây, cũng như các phân tử khác được nhận biết bằng cách sàng các thử nghiệm được mô tả trên đây, có thể được dùng để điều trị các rối loạn khác nhau, bao gồm bệnh ung thư, ở dạng dược phẩm.

Nếu CD79b polypeptit là nội bào và toàn bộ kháng thể được sử dụng làm các chất ức chế, việc tiếp thu kháng thể là được ưu tiên. Tuy nhiên, các lipofection hoặc liposom cũng có thể được sử dụng để phân phát kháng thể hoặc mảnh kháng thể, đến tế bào. Khi các mảnh kháng thể được sử dụng, mảnh ức chế nhỏ nhất mà gắn kết đặc hiệu với miền gắn kết của protein đích là được ưu tiên. Ví dụ, dựa ngay vào các trình tự vùng biến đổi của kháng thể, các phân tử peptit có thể được xác định mà vẫn có khả năng gắn kết trình tự protein đích. Các peptit có thể được tổng hợp về mặt hoá học và/hoặc được sản xuất bằng kỹ thuật ADN tái tổ hợp. Xem, ví dụ, Marasco *et al.,* Proc. Natl. Acad. Sci. USA, 90: 7889-7893 (1993).

Chế phẩm ở đây cũng có thể chứa nhiều hơn một hoạt chất nếu cần cho chỉ định cụ thể sẽ được điều trị, tốt hơn là có các hoạt tính bổ sung mà không có tác dụng ngược với nhau. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, chế phẩm này có thể bao gồm chất mà làm tăng cường chức năng của nó, như, ví dụ, chất độc tế bào, xytokin, chất hoá trị liệu hoặc chất ức chế phát triển. Các phân tử này thích hợp có mặt trong chế phẩm với lượng có hiệu quả cho mục đích định trước.

M. Dẫn xuất kháng thể

Kháng thể theo sáng chế còn được cải biến để chứa các phần không protein bổ sung mà đã biết trong lĩnh vực này và hiện có sẵn. Tốt hơn là, các phần ổn định để tạo dẫn xuất kháng thể là các polyme có thể hoà tan trong nước. Các ví dụ không giới hạn về các polyme có thể hoà tan trong nước bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, polyvinyl rượu, polyvinyl pyrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-l,3,6-trioxan, etylen/maleic anhydrit copolyme, axit polyamin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrolidon)polyetylen glycol, propropylen glycol homopolyme, prolypropylen oxit/etylen oxit co-polyme, polyol được polyoxyetyl hoá (ví dụ, glyxerol), polyvinyl rượu, và hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có các thuận lợi trong sản xuất do tính ổn định trong nước của nó. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ và có thể là mạch nhánh hoặc không phân nhánh. Số lượng các polyme được gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn vào, chúng có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Thông thường, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên việc xem xét bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, một số đặc tính hoặc chức năng của kháng thể sẽ được cải thiện, dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng trong điều trị dưới các điều kiện được xác định, v.v..

N. Phương pháp sàng

Phương án khác theo sáng chế là đề xuất phương pháp xác định sự có mặt của CD79b polypeptit trong mẫu được cho là chứa CD79b polypeptit, trong đó phương pháp này bao gồm cho mẫu tiếp xúc với thể liên hợp kháng thể-dược chất, mà gắn kết với CD79b polypeptit và xác định sự gắn kết của thể liên hợp kháng thể-dược chất của chúng, với CD79b polypeptit trong mẫu, trong đó sự có mặt của gắn kết này cho biết sự có mặt của CD79b polypeptit trong mẫu. Tuỳ ý, mẫu này có thể chứa các tế bào (mà có thể là tế bào ung thư) được cho là biểu hiện CD79b polypeptit. Thể liên hợp kháng thể-dược chất của chúng, được dùng trong phương pháp này có thể tuỳ ý được đánh dấu có thể phát hiện, được gắn với chất trợ rắn hoặc tương tự.

Phương án khác theo sáng chế là đề xuất phương pháp chẩn đoán sự có mặt của khối u ở động vật có vú, trong đó phương pháp này bao gồm (a) cho mẫu thử

nghiệm bao gồm tế bào mô thu được từ động vật có vú tiếp xúc với thể liên hợp kháng thể-dược chất của chúng, mà gắn kết với CD79b polypeptit và (b) phát hiện sự tạo thành phức hợp giữa thể liên hợp kháng thể-dược chất của chúng và CD79b polypeptit trong mẫu thử nghiệm, trong đó sự tạo thành phức hợp cho biết sự có mặt của khối u ở động vật có vú. Tuỳ ý, thể liên hợp kháng thể-dược chất của chúng, được đánh dấu có thể phát hiện, được đánh dấu có thể phát hiện, được gắn vào chất trợ rắn hoặc tương tự và/hoặc mẫu tế bào mô thu được từ cá thể có khối u ung thư.

IV. Phương pháp khác để sử dụng kháng thể kháng CD79b và liên hợp miễn dịch

A. Phương pháp chẩn đoán và phương pháp phát hiện

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD79b và liên hợp miễn dịch theo sáng chế là hữu ích để phát hiện sự có mặt của CD79b trong mẫu sinh học. Thuật ngữ "phát hiện" như được sử dụng ở đây bao gồm sự phát hiện số lượng hoặc chất lượng. Theo một số phương án, mẫu sinh học bao gồm tế bào hoặc mô. Theo một số phương án, mô này bao gồm các mô bình thường và/hoặc ung thư mà biểu hiện CD79b ở các mức cao hơn so với các mô khác, ví dụ, các tế bào B và/hoặc các mô liên quan đến tế bào B.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của CD79b trong mẫu sinh học. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể kháng CD79b dưới các điều kiện cho phép gắn kết kháng thể kháng CD79b với CD79 và phát hiện phức được tạo thành giữa kháng thể kháng CD79b và CD79b.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp chẩn đoán rối loạn liên quan đến biểu hiện CD79b gia tăng. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm cho tế bào thử nghiệm tiếp xúc với kháng thể kháng CD79b; xác định mức biểu hiện (định lượng hoặc định tính) của CD79b bởi tế bào thử nghiệm bằng cách phát hiện gắn kết kháng thể kháng CD79b với CD79b; và so sánh mức biểu hiện của CD79b bởi tế bào thử nghiệm với mức biểu hiện của CD79b bởi tế bào đối chứng (ví dụ, tế bào bình thường của mô giống nhau có nguồn gốc như tế bào thử nghiệm hoặc tế bào biểu hiện CD79b ở các mức có thể so sánh với tế bào bình thường này), trong đó mức độ biểu hiện cao hơn của CD79b bởi tế bào thử nghiệm như được so với tế bào đối chứng cho biết sự có mặt của rối loạn liên quan đến biểu hiện CD79b gia tăng. Theo một số phương án, tế bào thử nghiệm thu được từ cá thể được cho là mắc rối

loạn liên quan đến biểu hiện CD79b gia tăng. Theo một số phương án, rối loạn là rối loạn tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư hoặc khối u.

Các rối loạn tăng sinh tế bào ví dụ mà có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể theo sáng chế bao gồm rối loạn tế bào B và/hoặc rối loạn tăng sinh tế bào B bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm chiếm, NHL xâm chiếm tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và bệnh bạch cầu tế bào vỏ.

Theo một số phương án, phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện, ví dụ các phương pháp được mô tả trên đây, bao gồm phát hiện sự gắn kết của kháng thể kháng CD79b với CD79b được biểu hiện trên bề mặt của tế bào hoặc trong chế phẩm màng thu được từ tế bào biểu hiện CD79b trên bề mặt của nó. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với kháng thể kháng CD79b dưới các điều kiện cho phép gắn kết kháng thể kháng CD79b với CD79b và phát hiện nếu phức hợp được tạo thành giữa kháng thể kháng CD79b và CD79b trên bề mặt tế bào. Thử nghiệm ví dụ để phát hiện sự gắn kết của kháng thể kháng CD79b với CD79b được biểu hiện trên bề mặt của tế bào là thử nghiệm "FACS".

Một số phương pháp khác có thể được sử dụng để phát hiện sự gắn kết của kháng thể kháng CD79b với CD79b. Các phương pháp này bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các thử nghiệm gắn kết kháng nguyên mà là đã biết trong lĩnh vực này, như giọt Tây, thử nghiệm miễn dịch phóng xạ, ELISA (thử nghiệm hấp thụ miễn dịch liên kết enzym), thử nghiệm miễn dịch "sandwich", thử nghiệm kết tủa miễn dịch, thử nghiệm miễn dịch huỳnh quang, thử nghiệm miễn dịch protein A và hoá miễn dịch (IHC).

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD79b được đánh dấu. Các đánh dấu bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các đánh dấu hoặc các phần mà được phát hiện trực tiếp (như huỳnh quang, sắc tố, mật độ điện tử, huỳnh quang hoá học và các đánh dấu phóng xạ), cũng như các phần như enzym hoặc các phối tử, mà được phát hiện gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các đánh dấu ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các chất đồng vị phóng xạ ^{32}P, ^{14}C, $^{125}1$,

^{3}H, và ^{131}I, floropho như các chelat kim loại hiếm hoặc floretxein và các dẫn xuất của nó, rodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, luxeriferaza, ví dụ, luciferaza đom đóm và luxiferaza vi khuẩn (bằng Mỹ số 4,737,456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazinedion, horseradish peroxidaza (HRP), phosphataza kiềm, β-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, các oxidaza dị vòng như uricaza và xanthin oxidaza, được cặp đôi với enzym mà dùng hydro peroxit để oxy hoá tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, đánh dấu quay tròn, đánh dấu thể thực khuẩn, các gốc tự do ổn định và tương tự.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD79b được cố định trên chất nền không thể hoà tan. Việc làm cố định gây ra việc tách kháng thể kháng CD79b từ CD79b bất kỳ mà vẫn tự do trong dung dịch. Điều này thường được hoàn thành bằng cách làm cho không thể hoà tan kháng thể kháng CD79b trước quy trình thử nghiệm, như bằng cách hấp thụ với chất nền không thể hoà tan trong nước hoặc trên bề mặt (Bennich et al.., U.S. 3,720,760) hoặc bằng cách cặp đôi cùng hoá trị (ví dụ, bằng cách sử dụng glutaraldehyt liên kết ngang), hoặc bằng cách làm cho không thể hoà tan kháng thể kháng CD79b sau khi tạo thành phức giữa kháng thể kháng CD79b và CD79b, ví dụ, bằng cách kết tủa miễn dịch.

Phương án bất kỳ trên đây là chẩn đoán hoặc phát hiện có thể được thực hiện bằng cách sử dụng liên hợp miễn dịch theo sáng chế thay cho hoặc bổ sung vào kháng thể kháng CD79b.

B. Phương pháp điều trị

Kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng trong, ví dụ, phương pháp điều trị in vitro, ex vivo, và in vivo. Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh tế bào, in vivo hoặc in vitro, phương pháp này bao gồm cho tế bào tiếp xúc với kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch của chúng dưới các điều kiện cho phép gắn kết liên hợp miễn dịch với CD79b. "Ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh tế bào" có nghĩa là làm giảm sự phát triển hoặc tăng sinh tế bào bởi ít nhất là 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, 90%, 95%, hoặc 100%, và bao gồm gây chết tế bào. Theo một số phương án, tế bào là tế bào

khối u. Theo một số phương án, tế bào là tế bào B. Theo một số phương án, tế bào là mảnh ghép khác loại, ví dụ như được mô tả ở đây.

Theo một khía cạnh, kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế được sử dụng để điều trị hoặc ngăn ngừa rối loạn tăng sinh tế bào B. Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tế bào là liên quan đến sự biểu hiện và/hoặc hoạt tính gia tăng của CD79b. Ví dụ, theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tế bào B là liên quan đến biểu hiện của CD79b gia tăng trên bề mặt của tế bào B. Theo một số phương án, rối loạn tăng sinh tế bào B là khối u hoặc bệnh ung thư. Các ví dụ về rối loạn tăng sinh tế bào B sẽ được điều trị bởi kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế bao gồm nhưng không chỉ giới hạn đến, u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm chiếm, NHL xâm chiếm tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và bệnh bạch cầu tế bào vỏ.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị rối loạn tăng sinh tế bào B bao gồm cho cá thể dùng lượng có hiệu quả của kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch của chúng. Theo một số phương án, phương pháp để điều trị rối loạn tăng sinh tế bào B bao gồm cho cá thể dùng lượng có hiệu quả của dược phẩm bao gồm kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch kháng CD79b và, tuỳ ý, ít nhất là một chất điều trị bổ sung, như các chất được đề xuất dưới đây. Theo một số phương án, phương pháp điều trị rối loạn tăng sinh tế bào bao gồm cho cá thể dùng lượng có hiệu quả của dược phẩm bao gồm 1) liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng CD79b và chất độc tế bào; và tuỳ ý, 2) ít nhất là một chất điều trị bổ sung, như chất được nêu dưới đây.

Theo một khía cạnh, ít nhất là một trong số các kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể gắn kết CD79b từ các loài không phải là người. Do đó, các kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng để gắn kết CD79b, ví dụ, trong môi trường nuôi cấy tế bào chứa CD79b, ở người hoặc các động vật có vú khác có CD79b mà kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế liên kết ngang (ví dụ con tinh tinh, khỉ đầu chó, khỉ đuôi sóc, xynomolgus và khỉ nâu, chó, lợn, chuột đồng hoặc chuột nhà). Theo một phương án, kháng thể kháng CD79b hoặc liên

hợp miễn dịch có thể được sử dụng để tạo đích CD79b trên tế bào B bằng cách cho kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch tiếp xúc với CD79b để tạo thành phức kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch-kháng nguyên mà liên hợp độc tố tế bào liên hợp miễn dịch đi vào bên trong tế bào. Theo một phương án, CD79b là CD79b của người.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch có thể được sử dụng trong phương pháp gắn kết CD79b ở cá thể mắc rối loạn liên quan đến biểu hiện và/hoặc hoạt tính CD79b gia tăng, phương pháp này bao gồm cho cá thể này dùng kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch sao cho CD79b trong cá thể là được gắn kết. Theo một phương án, kháng thể gắn kết hoặc liên hợp miễn dịch được tiếp thu vào tế bào B biểu hiện CD79b. Theo một phương án, CD79b là CD79b của người và cá thể là cá thể người. Theo cách khác, cá thể có thể là động vật có vú biểu hiện CD79b mà kháng thể kháng CD79b gắn kết. Vẫn cá thể khác có thể là động vật có vú trong đó CD79b đã được đưa vào (ví dụ, bằng cách dùng CD79b hoặc bằng cách biểu hiện chuyển gen mã hoá CD79b).

Kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch có thể được dùng cho người nhằm mục đích điều trị. Hơn nữa, kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch có thể được dùng cho động vật có vú không phải người biểu hiện CD79b với kháng thể phản ứng ngang (ví dụ, động vật linh trưởng, chó, lợn, chuột đồng hoặc chuột nhà) nhằm mục đích thú y hoặc mô hình động vật là bệnh của người. Liên quan đến mô hình sau, các mô hình động vật này có thể là hữu ích để đánh giá hiệu quả điều trị của kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế (ví dụ, thử nghiệm các liều và thời gian dùng).

Kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được sử dụng riêng hoặc kết hợp với các chế phẩm khác trong điều trị. Ví dụ, kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng có thể được cùng dùng với ít nhất là một chất điều trị bổ sung và/hoặc tá dược. Theo một số phương án, chất điều trị bổ sung là chất độc tế bào, chất hoá trị liệu, hoặc chất ức chế phát triển. Theo một trong số các phương án này, chất hoá trị liệu là chất hoặc kết hợp các chất như, ví dụ, xyclophosphamit, hydroxydaunorubixin, adriamyxin, doxorubixin, vincristin (Oncovin™), prednisolon, CHOP, CVP, hoặc COP, hoặc điều trị miễn dịch như kháng CD20 (ví dụ, Rituxan®) hoặc kháng VEGF (ví dụ, Avastin®), trong đó điều trị kết hợp là hữu ích trong điều trị

bệnh ung thư và/hoặc rối loạn tế bào B như rối loạn tăng sinh tế bào B bao gồm u lympho, u lympho không Hodgkin (NHL), NHL xâm chiếm, NHL xâm chiếm tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính (CLL), bệnh bạch cầu tế bào lympho nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu tế bào lympho cấp tính (ALL), và bệnh bạch cầu tế bào vỏ.

Các điều trị kết hợp này được nêu trên đây bao gồm dùng kết hợp (trong đó hai hoặc nhiều chất điều trị là được bao gồm trong chế phẩm giống nhau hoặc riêng rẽ), và dùng riêng rẽ, trong trường hợp đó, việc dùng kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể xuất hiện trước, đồng thời và/hoặc sau, dùng chất điều trị bổ sung và/hoặc tá dược. Các kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế cũng có thể được sử dụng kết hợp với điều trị phóng xạ.

Kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế (và chất hoặc tá dược điều trị bổ sung bất kỳ) có thể được dùng theo các cách thích hợp bất kỳ, bao gồm dùng ngoài đường tiêu hoá, dưới da, tĩnh mạch, trong phổi và trong mũi, và nếu muốn để điều trị khu trú, dùng trong tổn thương. Việc truyền ngoài đường tiêu hoá bao gồm tiêm bắp, tiêm tĩnh mạch, trong động mạch hoặc dùng dưới da. Ngoài ra, kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch là được dùng thích hợp bằng cách tiêm mạch, tốt hơn là với liều giảm kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch. Phân liều có thể là bằng đường thích hợp, ví dụ bằng cách tiêm truyền, như tiêm tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, phụ thuộc vào một phần mà việc dùng là ngắn hoặc mạn tính.

Kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế sẽ được tạo thành, được phân liều và được dùng theo dạng thích hợp với thực tiễn y tế. Các yếu tố để xem xét theo sáng chế bao gồm rối loạn cụ thể sẽ được điều trị, động vật có vú cụ thể sẽ được điều trị, trình trạng lâm sàng của người bệnh, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí phân phát chất, phương pháp dùng, danh mục dùng và các yếu tố khác đã biết đối với thầy thuốc y khoa. kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch không cần, nhưng tuỳ ý được tạo thành với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn theo yêu cầu. Lượng có hiệu quả của chất khác phụ thuộc vào lượng kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch có mặt trong chế phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị và các yếu tố khác được mô tả trên đây. Thường được sử dụng trong các liều giống nhau và với các đường

dùng như được mô tả ở đây, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều được mô tả ở đây, hoặc trong liều bất kỳ và đường bất kỳ mà được xác định theo kinh nghiệm/theo lâm sàng là thích hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều thích hợp của kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế (khi được sử dụng riêng hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị bổ sung khác, như chất hoá trị liệu) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh sẽ được điều trị, loại kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch, tính nguy kịch và tiến trình bệnh, kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch được dùng cho mục đích ngăn ngừa hoặc điều trị, điều trị trước, lịch sử lâm sàng của người bệnh và đáp ứng với kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch, và theo ý muốn của bác sĩ điều trị. kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch là được dùng thích hợp cho người bệnh một lần hoặc trong hàng loạt điều trị. Phụ thuộc vào loại và tính nguy kịch của bệnh, khoảng từ 1μg/kg đến 100mg/kg (ví dụ 0,1mg/kg-20mg/kg) kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch có thể là liều khởi đầu để dùng cho người bệnh, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ hoặc bằng cách tiêm truyền liên tục. Một liều hàng ngày thường phải nằm trong khoảng từ 1μg/kg đến 100 mg/kg hoặc nhiều hơn, phụ thuộc vào các yếu tố được nêu trên đây. Để dùng nhắc lại trong thời gian vài ngày hoặc lâu hơn, phụ thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị sẽ là duy trì cho đến khi ngăn chặn mong muốn các triệu chứng bệnh xảy ra. Một liều ví dụ về kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch sẽ nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 10mg/kg. Do đó, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg hoặc 10mg/kg (hoặc kết hợp bất kỳ của chúng) của kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch có thể được dùng cho người bệnh. Các liều này có thể được dùng không liên tục, ví dụ hàng tuần hoặc hàng ba tuần (ví dụ sao cho người bệnh nhận khoảng từ hai đến hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch). Liều lượng khởi đầu cao hơn, tiếp theo bởi một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được dùng. Chế độ liều ví dụ bao gồm dùng liều lượng khởi đầu là khoảng 4mg/kg, tiếp theo hàng tuần duy trì liều khoảng 2mg/kg kháng thể. Tuy nhiên, các chế độ liều khác có thể là hữu ích. Tiến trình điều trị này là được kiểm tra dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông thường.

C. Các thử nghiệm hoạt tính

Kháng thể kháng CD79b và liên hợp miễn dịch theo sáng chế có thể được đặc trưng đối với các đặc tính vật lý/hoá học và/hoặc hoạt tính sinh học bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực này.

1. Các thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, thử nghiệm được đề xuất để xác định kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch của chúng có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, khả năng ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh tế bào (ví dụ, "hoạt tính giết chết tế bào"), hoặc khả năng gây chết tế bào, bao gồm gây chết tế bào theo chương trình (gây chết tế bào ung thư). Các kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch có hoạt tính sinh học in vivo và/hoặc in vitro cũng được đề xuất.

Theo một số phương án, kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch của chúng là được thử nghiệm đối với khả năng ức chế sự phát triển tế bào hoặc tăng sinh tế bào in vitro của nó. Các thử nghiệm ức chế sự phát triển tế bào hoặc tăng sinh tế bào là đã biết trong lĩnh vực này. Một số thử nghiệm đối với tăng sinh tế bào, được minh hoạ bởi thử nghiệm "giết chết tế bào" như được mô tả ở đây, xác định khả năng sống sót của tế bào. Khi thử nghiệm này là CellTiter-Glo™ Luminescent Cell Viability Assay, mà hiện có bán trên thị trường từ Promega (Madison, WI). Thử nghiệm đó xác định số lượng tế bào có khả năng sống sót trong nuôi cấy dựa trên lượng ATP có mặt, mà cho biết các tế bào hoạt hoá về mặt trao đổi chất. Xem Crouch et al (1993) J. Immunol. Meth. 160:81-88, US Pat. No. 6602677. Thử nghiệm này có thể được thực hiện trong đĩa 96 hoặc 384 giếng, làm cho nó có khả năng sửa đổi theo việc chiếu với số lượng lớn tự động (HTS). Xem Cree et al (1995) Anticancer Drugs 6:398-404. Quy trình thử nghiệm này bao gồm bổ sung chất phản ứng đơn (CellTiter-Glo® Reagent) trực tiếp vào tế bào được nuôi cấy. Điều này dẫn đến làm tiêu tế bào và sinh ra tính hiệu huỳnh quang được tạo ra bởi phản ứng luxiferaza. Tính hiệu huỳnh quang là tương ứng với lượng ATP có mặt mà tương ứng trực tiếp với số lượng tế bào có khả năng sống sót có mặt trong môi trường nuôi cấy. Các dữ liệu này được thông báo bởi thiết bị đo huỳnh quang hoặc thiết bị hình ảnh máy ảnh CCD. Đầu ra của huỳnh quang được biểu hiện như các đơn vị ánh sáng tương đối (RLU).

Thử nghiệm khác đối với tăng sinh tế bào là thử nghiệm "MTT", thử nghiệm thiết bị đo màu mà xác định sự oxy hoá 3-(4,5-dimetylthiazol-2-yl)-2,5-

diphenyltetrazol bromua thành formazan bằng reductaza ti thể. Tương tự thử nghiệm CellTiter-Glo™, thử nghiệm này cho biết số lượng tế bào hoạt tính về mặt trao đổi chất trong môi trường nuôi cấy tế bào. Xem, ví dụ, Mosmann (1983) J. Immunol. Meth. 65:55-63, và Zhang et al. (2005) Cancer Res. 65:3877-3882.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD79b là được thử nghiệm đối với khả năng gây chết tế bào của nó in vitro. Các thử nghiệm để gây chết tế bào là đã biết trong lĩnh vực này. Theo một số phương án, các thử nghiệm này xác định, ví dụ, mất tính nguyên vẹn của màng như được chỉ ra bằng cách hấp thu propidi iodua (PI), xanh trypan (xem Moore et al. (1995) Cytotechnology, 17: 1-11), hoặc 7AAD. Trong thử nghiệm hấp thu PI mẫu, các tế bào được nuôi cấy trong Dulbecco's Modified Eagle Medium (D-MEM):Ham's F-12 (50:50) được bổ sung 10% FBS được làm bất hoạt nhiệt (Hyclone) và 2mM L-glutamin. Do đó, thử nghiệm này được thực hiện với sự không có mặt của các tế bào bổ sung và phản ứng kích thích miễn dịch. Tạo hạt tế bào ở mật độ là 3 x 10^6 /đĩa trong các đĩa 100 x 20mm và cho phép gắn kết qua đêm. Môi trường được loại bỏ và thay thế bằng môi trường sạch riêng rẽ hoặc môi trường chứa các nồng độ khác nhau của kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch. Các tế bào được ủ trong thời gian 3 ngày. Sau khi điều trị, rửa các lớp đơn bằng PBS và được phát hiện bằng cách trypsin hoá. Sau đó, ly tâm các tế bào ở 1200 vòng/phút trong 5 phút ở 4^0C, hạt được tạo huyền phụ lại trong 3ml chất đệm gắn kết Ca^{2+} lạnh (10mM Hepes, độ pH = 7,4, 140mM NaCl, 2,5mM $CaCl_2$) và được tạo dịch lỏng vào 35mm nắp lọc 12 x 75mm ống (1ml/ống, 3 ống/nhóm điều trị) để loại bỏ các khối tế bào. Sau đó, các ống nhận PI (10µg/ml). Các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị đo dòng chảy FACSCAN™ và phần mềm FACSCONVERT™ CellQuest (Becton Dickinson). Các kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch mà gây mức độ chết tế bào có ý nghĩa về mặt thống kê như được xác định bởi sự hấp thu PI do đó được xác định.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch là được thử nghiệm đối với khả năng gây chết tế bào của nó (chết tế bào theo chương trình) in vitro. Thử nghiệm ví dụ đối với các kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch mà gây chết tế bào là thử nghiệm gắn kết annexin. Trong thử nghiệm gắn kết annexin mẫu, các tế bào được nuôi cấy và tạo hạt như được mô tả trong đoạn trước đây. Môi trường được loại bỏ và thay thế bằng môi trường sạch riêng rẽ hoặc môi trường chứa từ 0,001 đến 10µg/ml kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch. Trong thời gian ủ ba ngày, rửa các lớp

đơn bằng PBS và được tách bằng cách trypsin hoá. Sau đó, ly tâm các tế bào, tạo huyền phù lại trong chất đệm gắn kết Ca^+ và được tạo dịch lỏng vào các ống như được nêu trong đoạn trước đây. Sau đó, ống nhận annexin được đánh dấu (ví dụ annexin V-FITC) (1µg/ml). Các mẫu được phân tích bằng cách sử dụng thiết bị đo dòng chảy FACSCAN™ và phần mền FACSCONVERT™ CellQuest (BD Biosciences). Các kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch mà bao gồm các mức gắn kết annexin có ý nghĩa về mặt thống kê so với đối chứng do đó được xác định. Thử nghiệm ví dụ khác đối với các kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch mà gây chết tế bào là thử nghiệm thiết bị đo màu histon ADN ELISA để phát hiện sự thoái biến trong nucleosom của ADN hệ gen. Thử nghiệm này có thể được thực hiện bằng cách sử dụng, ví dụ, kit Cell Death Detection ELISA (Roche, Palo Alto, CA).

Các tế bào để sử dụng trong các thử nghiệm bất kỳ trên đây in vitro bao gồm các tế bào hoặc dòng tế bào mà biểu hiện tự nhiên CD79b hoặc được sinh ra để biểu hiện CD79b. Các dòng tế bào này bao gồm các tế bào khối u mà biểu hiện quá mức CD79b so với các tế bào bình thường có nguồn gốc từ mô giống nhau. Các tế bào này cũng bao gồm các dòng tế bào (bao gồm các dòng tế bào khối u) mà biểu hiện CD79b và các dòng tế bào mà không biểu hiện bình thường CD79b nhưng đã được chuyển nhiễm với axit nucleic mã hoá CD79b.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch của chúng là được thử nghiệm đối với khả năng ức chế sự phát triển hoặc tăng sinh tế bào in vivo của chúng. Theo một số phương án, kháng thể kháng CD79b hoặc liên hợp miễn dịch của chúng là được thử nghiệm đối với khả năng ức chế phát triển khối u của chúng in vivo. Các hệ mô hình in vivo, như các mô hình ghép khác loại, có thể được sử dụng cho thử nghiệm này. Trong hệ ghép khác loại ví dụ, các tế bào khối u của người được đưa vào động vật không phải là người được làm tổn thương miễn dịch, ví dụ, chuột SCID. kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch theo sáng chế được dùng cho động vật. Khả năng của kháng thể hoặc liên hợp miễn dịch để ức chế hoặc làm giảm sự phát triển khối u là được xác định. Theo một số phương án về hệ ghép khác loại trên đây, các tế bào khối u của người là tế bào khối u từ người bệnh. Các tế bào này hữu ích để tạo ra các mô hình ghép khác loại bao gồm bệnh bạch cầu và dòng tế bào u lympho, mà bao gồm nhưng không chỉ giới hạn đến các tế bào BJAB-luc (dòng tế bào u lympho Burkitt âm EBV được chuyển nhiễm với gen thông báo luxiferaza), tế bào

Ramos (ATCC, Manassas, VA, CRL-1923), tế bào SuDHL-4 (DSMZ, Braunschweig, Germany, AAC 495), tế bào DoHH2 (xem Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 5:221-224 (1991) và Kluin-Neilemans, H.C. et al., Leukemia 8:1385-1391 (1994)), tế bào Granta-519 (xem Jadayel, D.M. et al, Leukemia 11(1):64-72 (1997)). Theo một số phương án, tế bào khối u của người được đưa vào động vật không phải là người được tạo miễn dịch thích hợp bằng cách tiêm dưới da hoặc bằng cách cấy ghép vào vị trí thích hợp, như gan bàn chân của động vật có vú.

2. Các thử nghiệm gắn kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD79b là được thử nghiệm đối với hoạt tính gắn kết kháng nguyên của nó. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể kháng CD79b là được thử nghiệm đối với khả năng gắn kết của nó với CD79b được biểu hiện trên bề mặt tế bào. Thử nghiệm FACS có thể được sử dụng cho thử nghiệm này.

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để xác định kháng thể đơn dòng mà cạnh tranh với kháng thể MA79b của chuột và/hoặc kháng thể MA79b.v18 được làm thích hợp với người và/hoặc kháng thể MA79b.v32 được làm thích hợp với người để gắn kết với CD79b. Theo một số phương án, kháng thể này cạnh tranh gắn kết với epitop giống nhau (ví dụ, epitop peptit mạch thẳng hoặc thích hợp) mà được gắn kết kháng thể MA79b của chuột, kháng thể MA79bv.17 được làm thích hợp với người và/hoặc kháng thể MA79bv.17 được làm thích hợp với người và/hoặc MA79b.v28 được làm thích hợp với người và/hoặc MA79b.v32 được làm thích hợp với người. Các thử nghiệm cạnh tranh ví dụ bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, các thử nghiệm thông thường như được nêu trong Harlow and Lane (1988) Antibodies: A Laboratory Manual ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY). Các phương pháp ví dụ chi tiết để tạo bản đồ epitop mà kháng thể gắn kết được nêu trong Morris (1996) "Epitope Mapping Protocols," in Methods in Molecular Biology vol. 66 (Humana Press, Totowa, NJ). Hai kháng thể gắn kết với epitop giống nhau nếu mỗi kháng thể phong bế gắn kết của kháng thể khác bởi 50% hoặc nhiều hơn.

Trong thử nghiệm cạnh tranh ví dụ, CD79b được làm bất động được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà gắn kết với CD79b (ví dụ, kháng thể MA79b của chuột, kháng thể MA79b.v17 được làm thích hợp với người

và/hoặc kháng thể MA79b.v18 được làm thích hợp với người và/hoặc MA79b.v28 được làm thích hợp với người và/hoặc MA79b.v32 được làm thích hợp với người) và kháng thể không được đánh dấu thứ hai là được thử nghiệm đối khả năng cạnh tranh của chúng với kháng thể thứ nhất để gắn kết với CD79b. kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi thể lai. Như đối chứng, CD79b được làm bất động được ủ trong dung dịch bao gồm kháng thể được đánh dấu thứ nhất nhưng không phải là kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ dưới các điều kiện cho phép gắn kết kháng thể thứ nhất với CD79b, lượng dư kháng thể không được gắn kết là được loại bỏ và lượng đánh dấu liên quan đến CD79b được làm bất động là được xác định. Nếu lượng đánh dấu liên quan đến CD79b được làm bất động về căn bản là giảm trong mẫu thử nghiệm so với mẫu đối chứng, sau đó chỉ ra rằng kháng thể thứ hai là cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để gắn kết với CD79b. Theo một số phương án, CD79b được làm bất động là có mặt trên bề mặt tế bào hoặc trong chế phẩm màng thu được từ tế bào biểu hiện CD79b trên bề mặt của nó.

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD79b được tinh chế còn được đặc trưng bởi nhiều thử nghiệm bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, trình tự tận cùng N, phân tích axit amin, sắc ký lỏng áp xuất cao ngoại cỡ không biến tính (HPLC), quang phổ khối, sắc ký trao đổi ion và tiêu hoá papain.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể khác nhau mà có một số nhưng không phải tất cả chức năng phản ứng kích thích, mà làm cho nó mong muốn cho nhiều ứng dụng trong đó chu kỳ nửa phân rã của kháng thể in vivo là một số chức năng phản ứng kích thích quan trọng (như phần bổ sung và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Theo một số phương án, các hoạt tính Fc của kháng thể được xác định để đảm bảo rằng chỉ các đặc tính mong muốn là được duy trì. Các thử nghiệm độc tố tế bào in vitro và/hoặc in vivo có thể được tiến hành để xác nhận việc giảm/làm suy yếu các hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, thử nghiệm gắn kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể thiếu gắn kết FcγR (tương tự ở đây là thiếu hoạt tính ADCC), nhưng vẫn còn khả năng gắn kết FcRn. Các tế bào nguyên thuỷ để qua trung gian ADCC, các tế bào NK, biểu hiện Fc(chỉ RIII, trong khi đó các monoxyt biểu hiện Fc(RI, Fc(RII và Fc(RIII. Sự biểu hiện FcR trên các tế bào tạo huyết được tổng kết trong Bảng 3 ở trang 464 của Ravetch and Kinet, Annu. Rev. Immunol. 9:457-92 (1991). Ví dụ về thử nghiệm in vitro để đánh giá hoạt tính ADCC của phân

tử quan tâm là được mô tả trong bằng Mỹ số 5,500,362 hoặc 5,821,337. Các tế bào phản ứng kích thích hữu ích đối với thử nghiệm này bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào Natural Killer (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử quan tâm có thể được đánh giá in vivo, ví dụ, trong mô hình động vật như được mô tả trong Clynes et al. PNAS (USA) 95:652-656 (1998). Các thử nghiệm gắn kết CIq cũng có thể được thực hiện để xác nhận rằng kháng thể là không có khả năng gắn kết CIq và do đó thiếu hoạt tính CDC. Để đánh giá hoạt hoá bổ sung, thử nghiệm CDC, ví dụ như được mô tả trong Gazzano-Santoro et al., J. Immunol. Methods 202: 163 (1996), có thể được thực hiện. Việc xác định gắn kết FcRn và in vivo tính rõ ràng/chu kỳ nửa phân rã cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ sau đây nhằm minh hoạ sáng chế và không làm giới hạn phạm vi sáng chế theo cách bất kỳ

Các chất phản ứng hiện có bán trên thị trường được nêu trong các ví dụ được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất trừ phi có quy định khác. Các kháng thể được sử dụng trong các ví dụ này bao gồm các kháng thể hiện có bán trên thị trường và bao gồm, nhưng không chỉ giới hạn đến, kháng thể kháng CD79b (kháng thể mua của Biomeda (Foster City, CA) hoặc BDbioscience (San Diego, CA) hoặc Ancell (Bayport, MN)), kháng thể kháng CD79b (được sinh ra từ thể lai được lưu giữ với ATCC như HB11413 ngày 20/7/1993), và kháng thể khảm kháng CD79b (bao gồm miền biến đổi từ các kháng thể được sinh ra các thể lai được lưu giữ với ATCC như HB11413 ngày 20/7/1993). Nguồn của các tế bào này được xác định trong các ví dụ sau đây và trong bản mô tả, theo số lữu giữ ATCC, là the American Type Culture Collection, Manassas, VA.

Ví dụ 1: Sinh ra kháng thể được làm thích hợp với người kháng CD79b

Số gốc theo Kabat (Kabat *et al., Sequences of proteins of immunological interest*, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)). Các chữ viết tắt axit amin chữ cái đơn là được sử dụng. Sự thoái biến ADN được thể hiện bằng cách sử dụng mã IUB (N = A/C/G/T, D = A/G/T, V = A/C/G, B= C/G/T, H= A/C/T, K = G/T, M = A/C, R = A/G, S = G/C, W= A/T, Y = C/T).

A. Ghép kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người

Các kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người khác nhau được sin hra. Các miền VL và VH từ kháng thể MA79b của chuột (MA79b) (Roswell Park Cancer Institute; Okazaki et al., *Blood*, 81:84-94 (1993)) được sắp xếp với các miền VL liên ứng của người kappa I (huKI) và các miền VH liên ứng phân nhóm III của người (huIII). Để tạo ra mảnh ghép HVR, khung VH nhận, mà khác với miền VH liên ứng phân nhóm III của người ở 3 vị trí: R71A, N73T, và L78A (Carter *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89:4285 (1992)) là được sử dụng. Các vùng siêu biến từ MA79b của chuột (MA79b) được sinh ra vào khung liên ứng nhận của người để sinh ra mảnh ghép HVR trực tiếp của MA79b (ở đây được gọi là "mảnh ghép MA79b" hoặc "mảnh ghép MA79b" hoặc kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b hoặc "mảnh ghép huMA79b"). Trong miền VL, các miền sau đây được ghép với nhận liên ứng của người: các vị trí 24-34 (L1), 50-56 (L2) và 89-97 (L3) (Fig. 7A-B). Trong miền VH, các vị trí 26-35 (H1), 49-65 (H2) và 93-102 (H3) được ghép (Fig. 8A-B). MacCallum et al. (MacCallum *et al., J. Mol. Biol.*, 262: 732-745 (1996)) phân tích kháng thể và cấu trúc tinh thể phức hợp kháng nguyên và phát hiện các vị trí 49, 93 và 94 của chuỗi nặng là một phần của vùng tiếp xúc và do đó bao gồm trong định nghĩa về HVR-H2 và HVR-H3 khi nhân hoá kháng thể.

Biến thể ghép trực tiếp (mảnh ghép huMA79b) được sinh ra bằng cách đột biến gen Kunkel, như Fab được thể hiện trên thể thực khuẩn và IgG, bằng cách sử dụng oligonucleotit riêng rẽ đối với mỗi vùng siêu biến. Các thể đơn dòng chính xác được đánh giá bằng cách tạo trình tự ADN.

B. Các biến thể ghép kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người

Các biến thể ghép kháng thể kháng CD79b mà bao gồm tính đa dạng đột biến trong các vùng siêu biến của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b được sinh ra bằng cách sử dụng các thư viện thể hiện thể thực khuẩn. Các biến thể ghép kháng thể kháng CD79b bao gồm biến thể vị trí đơn trong các HVR (Fig. 9) hoặc nhiều biến thể vị trí trong HVR (Fig. 10).

C. Chọn lọc thể thực khuẩn

Để chọn lọc thể thực khuẩn, miền ngoại bào của CD79b ($huCD79b_{ecd}$) (2 μg/ml) được làm cố định trong PBS trên các đĩa vi chuẩn MaxiSorp (Nunc) qua đêm ở 4°C. Phong bế các đĩa trong ít nhất là 1 giờ bằng cách sử dụng Casein Blocker (Pierce).

Thu hoạch thể thực khuẩn từ dịch nổi môi trường nuôi cấy và được tạo huyền phù trong PBS chứa 0,5 % BSA và 0,05% Tween 20 (PBSBT). Sau khi bổ sung thư viện thể thực khuẩn và chọn lọc thể thực khuẩn trong 2 giờ, rửa các giếng vi chuẩn với PBS chứa 0,05 % Tween 20 (PBST) để loại bỏ thể thực khuẩn không được gắn kết và thể thực khuẩn được gắn kết được tách rửa bằng cách ủ các giếng với 100mM HCl trong 30 phút. Tính nghiêm ngặt chọn lọc có thể được gia tăng bằng cách sử dụng các vòng chọn lọc liên tục bằng cách gia tăng số lần rửa với PBST hoặc cbằng cách ủ với huCD79b$_{ecd}$ có thể hoà tan để gia tăng thời gian tách rửa.

Làm trung hoà thể thực khuẩn được tách rửa với 1M Tris, độ pH = 8 và được khuếch đại bằng cách sử dụng tế bào xanh XL1 và thể thực khuẩn hỗ biến M13/KO7 và được phát triển qua đêm ở 37 °C trong 2YT, 50 µg/ml carbenaxilin. Các chuẩn độ của thể thực khuẩn được tách rửa từ giếng chứa đích được so với các chuẩn độ của thể thực khuẩn được thu hồi từ giếng chứa không đích để đánh giá sự làm giàu.

D. Sản xuất Fab và sản xuất IgG

Để biểu hiện Fab protein để xác định ái lực, mã bộ ba ngừng được đưa vào giữa chuỗi nặng và g3 trong vectơ thể hiện thể thực khuẩn. Các thể đơn dòng được biến nạp vào tế bào E. coli 34B8 và được phát triển trong môi trường Complete C.R.A.P. ở 30°C (Presta et al. *Cancer Res.* 57: 4593-4599 (1997)). Thu hoạch tế bào bằng cách ly tâm, tạo huyền phù trong PBS, 100µM PMSF, 100µM benzamidin, 2,4mM EDTA và phá vỡ bằng cách sử dụng thiết bị vi hoá lỏng. Fab được tinh chế với sắc ký ái lực Protein G.

Đối với mục đích sàng, các biến thể IgG được sản xuất ban đầu trong các tế bào 293. Vectơ mã hoá đối với VL và VH (25 µg) được chuyển nhiễm vào các tế bào 293 bằng cách sử dụng hệ FuGene. 500µl FuGene được trộn với 4,5ml môi trường DMEM không chứa FBS và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 5 phút. Mỗi chuỗi (25µg) được bổ sung vào hỗn hợp này và được ủ ở nhiệt độ trong phòng trong 20 phút và sau đó được chuyển vào bình để chuyển nhiễm qua đêm ở 37°C trong 5% CO_2. Ngày sau đó, môi trường chứa hỗn hợp chuyển nhiễm được loại bỏ và được thay thế với 23ml môi trường PS04 với 0,1ml/L yếu tố tạo vết (A0934) và 10mg/L insulin (A0940). Ủ tế bào trong 5 ngày nữa sau đó thu hoạch môi trường ở 1000 vòng/phút trong 5 phút và được lọc tiệt trùng bằng cách sử dụng 0,22µm chất lọc gắn kết protein thấp. Bảo quản các mẫu ở 4°C sau đó bổ sung 2,5ml 0,1% PMSF đối với mỗi 125ml môi trường.

E. Xác định ái lực (thử nghiệm Biacore)

Để xác định ái lực của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b, miền ngoại bào của CD79b của người ($huCD79b_{ecd}$) được biểu hiện ở các tế bào CHO riêng hoặc như dung hợp Fc ($huCD79b_{ecd}$-Fc) và được tinh chế bằng các phương pháp thông thường. Ngoài ra, peptit 16 axit amin (ARSEDRYRNPKGSACK) (SEQ ID NO: 16) chứa epitop đối với MA79b được tổng hợp theo cách thông thường.

Đặc trưng của epitop đối với kháng thể MA79b (được đánh dấu như "peptit thử nghiệm" trong Fig. 19) được mô tả trước trong đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 11/462,336, nộp ngày 3/8/2006. Epitop đối với kháng thể MA79b được khu trú trong vùng peptit ngoại bào ở bên ngoài miền chuyển màng và có mặt ở dạng toàn bộ chiều dài và được cắt của CD79b của người (Cragg, *Blood,* 100(9): 3068-76 (2002)), mà được mô tả trong tế bào B thông thường và ắc tính (Hashimoto, S. et al., *Mol. Immunol.,* 32(9): 651-9 (1995); Alfarano et al., *Blood,* 93(7): 2327-35 (1999)). Dạng được cắt của CD79b thiếu toàn bộ miền ngoại bào tương tự Ig (miền ngoại bào tương tự Ig mà không có mặt ở dạng không được cắt được ghép của CD79b được tạo hộp trong Fig. 19)

Gắn kết của Fab và biến thể IgG của MA79b, kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b hoặc biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b với $huCD79b_{ecd}$ được làm bất định hoặc huCD79b-Fc hoặc peptit 16 axit amin chứa epitop đối với MA79b được xác định bởi cộng hưởng plasma bề mặt. Xác định ái lực được thực hiện bởi cộng hưởng plasmon bề mặt bằng cách sử dụng BIAcore™-2000. Kháng nguyên, $huCD79b_{ecd}$ hoặc huCD79b-Fc được làm cố định (khoảng 50 – 200 RU) trong 10mM natri axetat độ pH = 4,8 trên chip cảm biến CM5. Do hiệu quả ái lực lớn, việc xác định ái lực là nhạy với lượng $huCD79b_{ecd}$ được làm cố định. Đối với mục đích này, ái lực, được xác định đối với các mẫu trên các ngày khác nhau, được làm thông thường hoá với MA79b mà là dọc theo bên ngoài như tiêu chuẩn. Trong các thửnghiệm mà gắn kết được xác định với peptit 16 axit amin chứa epitop đối với MA79b (ARSEDRYRNPKGSACK) (SEQ ID NO: 16), peptit được biotinyl hoá được bắt (khoảng 20 RU) trên chip cảm biến được bọc ngoài streptavidin. Biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b được tinh chế (như Fab hoặc IgG) (loạt pha loãng gấp 2 lần từ 0,5 đến 1000 nM trong

PBST) được tiêm ở tốc độ dòng là 30µL/phút. Mỗi mẫu được phân tích với sự kết hợp 4 phút và phân ly 10 phút. Sau mỗi lần tiêm, chip được sinh ra bằng cách sử dụng 10mM Glyxin độ pH = 1,7.

Đáp ứng gắn kết được hiệu chỉnh bằng cách trừ tế bào dòng đối chứng từ tế bào dòng biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (như Fab hoặc IgG). Mô hình 1:1 Languir thích hợp đồng thời là k_{on} và k_{off} được sử dụng để phân tích động học.

F. Phân tích gắn kết (phân tích FACS)

Để xác định tiếp sự gắn kết của biến thể Fab của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b hoặc các biến thể kháng thể, gắn kết của Fab và/hoặc IgG với các tế bào DoHH-2 được phân tích bằng cách sử dụng phân tích FACS. Hơn nữa, sự gắn kết của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b với các tế bào BJAB-luxiferaza được phân tích bằng cách sử dụng phân tích FACS.

Để phân tích FACS các biến thể Fab của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (phiên bản IgG được sử dụng làm đối chứng)), các tế bào DoHH-2 (1×10^6 trong thể tích 100µl) được ủ lần đầu tiên với hoặc không với 1µg kháng thể đơn dòng kháng CD79b của chuột ban đầu (MA79b) trong 30 phút, trước khi thêm 1µg biến thể Fab riêng rẽ (hoặc kháng thể đối chứng). Chuỗi nhẹ kappa, Ig của chuột kháng người được liên hợp PE (thể đơn dòng G20-193, BD Biosciences, San Diego, CA) được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ hai, do tất cả biến thể Fab mang chuỗi nhẹ kappa và các tế bào DoHH-2 không biểu hiện chuỗi nhẹ kappa trên bề mặt tế bào.

Để phân tích FACS bổ sung, các biến thể IgG của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (phiên bản IgG của chMA79b được sử dụng làm đối chứng), 1,0µg, 0,1µg hoặc 0,01µg của kháng thể được chuẩn độ/triệu tế bào của tế bào BJAB-luxiferaza. Ig của chuột kháng người được liên hợp PE được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ hai.

G. Xác định ái lực (phân tích Scatchard)

Để xác định tiếp sự gắn kết của các biến thể IgG có các thay đổi trong HVR-L2 và HVR-H3 (huMA79b L2/H3), sự gắn kết của các biến thể IgG được iot hoá với tế

bào BJAB biểu hiện CD79b của người và CD79b của xynomologous được phân tích và việc phân tích Scatchard được thực hiện.

Để phân tích Scatchard, 0,5nM I^{125} được đánh dấu MA79b hoặc huMA79b L2/H3 được cạnh tranh đối với MA79b hoặc huMA79b L2/H3 không được đánh dấu tương ứng, nằm trong khoảng từ 50 đến 0,02nM (bước 12 loạt pha loãng 1:2) với sự có mặt của dòng BJAB được chuyển nhiễm biểu hiện xynomologous-CD79b và CD79b nội sinh của người. Sau một giờ ủ ở 4°C, rửa tế bào và đếm hạt tế bào được đọc bởi thiết bị đọc gama (1470 WIZARD Automatic Gamma Counter; Perkin Elmer, Walthem, MA). Tất cả các điểm được thực hiện ba lần và được đếm trong 10 phút. CPM trung bình được sử dụng để tính toán Kd bằng cách sử dụng chương trình New Ligand (Genentech, South San Francisco, CA).

Kết quả và thảo luận

A. Kết quả của việc sinh ra kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người

Khung nhận của người được sử dụng để tạo ra kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người bao gồm miền VL kappa I liên ứng của người và biến thể của miền VH liên ứng phân nhóm III của người. Miền VH biến thể có 3 thay đổi từ liên ứng của người: R71A, N73T và L78A. Các miền VL và VH của MA79b được sắp xếp với các miền phân nhóm III và kappa I của người; mỗi HVR được nhận biết và sau đó được ghép vào khung nhận của người để sinh ra mảnh ghép HVR mà có thể được thể hiện như Fab trên thể thực khuẩn (các Fig. 7 và 8).

Thể thực khuẩn thể hiện mảnh ghép MA79b như Fab được gắn kết với $huCD79b_{ecd}$ được làm cố định (các dữ liệu không được thể hiện). Tuy nhiên, khi trình tự ghép huMA79b được biểu hiện là IgG, phân tích FACS ái lực của chúng đối với $huCD79b_{ecd}$ cho biết rằng ái lực gắn kết đã được giảm bởi hơn 100 lần (dữ liệu không được thể hiện) và phân tích Biacore cho biết mất hơn 50 lần (Fig. 11).

1. Sửa chữa CDR

Các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b mà có khả năng gắn kết với $huCD79b_{ecd}$ được làm cố định với các thay đổi trình tự sau đây được nhận biết.

Chỉ các thay đổi trình tự tạo đích HVR trong VL được quan sát trong các thư viện chứa các thay đổi vị trí đơn và được thể hiện trong Fig. 9 (đối với đột biến L1: Q27K (SEQ ID NO: 17; đột biến SPL-2), (đối với đột biến L2: L54R (SEQ ID NO: 18), E55K (SEQ ID NO: 19)), và (đối với đột biến L3: E93S (SEQ ID NO: 20; đột biến SPL-5), E93K (SEQ ID NO: 21)).

Chỉ các thay đổi trình tự tạo đích HVR trong L2, L3, H1 và H3 được quan sát trong các thư viện chứa nhiều thay đổi vị trí và được thể hiện trong Fig. 10 (đối với đột biến L2: S52R, N53K, E55G và S56R (SEQ ID NO: 22; L2-2 đột biến); N53R (SEQ ID NO: 23); S52R, N53K, E55G và S56N (SEQ ID NO: 24); S52R, N53K, E55K và S56R (SEQ ID NO: 25); S52R, N53Y, E55K và S56R (SEQ ID NO: 26; L2-29 đột biến); S52R, N53K và E55K (SEQ ID NO: 27); S52R, N53K và E55A (SEQ ID NO: 28); S52G, N53I, E55A và S56R (SEQ ID NO: 29); S52R, N53K, E55R (SEQ ID NO: 30); S52R, N53K và E55G (SEQ ID NO: 31; L2-38 đột biến); S52R, N53H, E55K và S56R (SEQ ID NO: 32); A51S, S52R, N53Y, E55S và S56R (SEQ ID NO: 33); A51G, N53K, E55L và S56R (SEQ ID NO: 34); L54R và E55K (SEQ ID NO: 35); N53K và E55G (SEQ ID NO: 36); S52R, N53Y, E55R và S56R (SEQ ID NO: 37); S52R, N53R, E55R và S56T (SEQ ID NO: 38); S52R, N53R, E55G và S56R (SEQ ID NO: 39); S52R, N53Q, L54R, E55K và S56R (SEQ ID NO: 40); S52R, N53K, E55L và S56R (SEQ ID NO: 41); S52R, N53K, E55K và S56N (SEQ ID NO: 42); S52R, N53K, E55G và S56T (SEQ ID NO: 43); S52R, N53K, E55G và S56G (SEQ ID NO: 44); và S52R, N53K, E55A và S56R (SEQ ID NO: 45)), (đối với đột biến L3: E93A (SEQ ID NO: 46); E93Q (SEQ ID NO: 47); không đột biến (SEQ ID NO: 48); E93D (SEQ ID NO: 49); E93L (SEQ ID NO: 50); Q89N, Q90N, E93G và T97N (SEQ ID NO: 51); Q90P, S91D, D94A và L96R (SEQ ID NO: 52); Q89D, S91R và E93A (SEQ ID NO: 53)), (đối với đột biến H1: T28P, S30T, S31R và E35S (SEQ ID NO: 54); T28P, S30R và E35Q (SEQ ID NO: 55); T28P, S30T và E35N (SEQ ID NO: 56); T28P, S30T, S31R và E36N (SEQ ID NO: 57; H1-6 đột biến)); S30N, S31R và E35N (SEQ ID NO: 58); T28S và S30K (SEQ ID NO: 59); G26P, T28S, F29L, S30C, S31T, W33F và E35D (SEQ ID NO: 60); T28Y và S30T (SEQ ID NO: 61); T28P, S30G, S31R, I34V và E35N (SEQ ID NO: 62); S30K và S31K (SEQ ID NO: 63); T28P, S30T và E35Q (SEQ ID NO: 64); T28P, S30R và S31R (SEQ ID NO: 65); T28P, F29V, S30G, S31R và E35S (SEQ ID NO: 66); T28P, S30N, S31R và E35N (SEQ ID NO: 67; H1-1 đột

biến); T28G, S30T và E35S (SEQ ID NO: 68); S30T, I34L và E35S (SEQ ID NO: 69); S30T (SEQ ID NO: 70); S31G và E35N (SEQ ID NO: 71); S30R, S31R và E35N (SEQ ID NO: 72); T28S, S30R và E35N (SEQ ID NO: 73); T28S, S30R, S31R và E35N (SEQ ID NO: 74); T28S, S30R và S31R (SEQ ID NO: 75); T28S, S30P, I34L và E35Q (SEQ ID NO: 76); T28P, S30T và S31R (SEQ ID NO: 77); T28P và S31G (SEQ ID NO: 78); T28P, S30R và E35S (SEQ ID NO: 79); T28P, S30R và E35N (SEQ ID NO: 80); T28P, S30R và S31G (SEQ ID NO: 81); T28P, S30N và S31R (SEQ ID NO: 82); T28P, S30N, S31G và E35N (SEQ ID NO: 83); T28N, F29V, I34L và E35S (SEQ ID NO: 84); Y27F, T28P, S30T và E35S (SEQ ID NO: 85); và Y27F, T28P, S30N, S31R và E35N (SEQ ID NO: 86)) và (đối với các đột biến H3: V98I và F100L (SEQ ID NO: 87; H3-12 đột biến); không đột biến (SEQ ID NO: 88); Y99K và F100L (SEQ ID NO: 89); F100L (SEQ ID NO: 90); V98I (SEQ ID NO: 91); V98F, Y99C và F100L (SEQ ID NO: 92); F100L (SEQ ID NO: 93); V98I, Y99R và F100L (SEQ ID NO: 94; H3-10 đột biến); V98I, Y99K và F100L (SEQ ID NO: 95); V98I và Y99R (SEQ ID NO: 96); V98I (SEQ ID NO: 97); D101S (SEQ ID NO: 98); Y99V và F100L (SEQ ID NO: 99); Y99R và F100L (SEQ ID NO: 100); Y99R (SEQ ID NO: 101); Y99F và F100L (SEQ ID NO: 102); V98I và F100L (SEQ ID NO: 103); V98I (SEQ ID NO: 104); V96R, Y99C và F100L (SEQ ID NO: 105); và V96I (SEQ ID NO: 106)).

Các thể đơn dòng chọn lọc được tạo cấu trúc lại như Fab để phân tích bởi FACS và như IgG để phân tích thêm bởi Biacore và Scatchard.

a. Xác định ái lực (phân tích Biacore)

Như được hể hiện trong Fig. 11, thể hiện sự phân tích Biacore, phương pháp sửa chữa CDR này nhận biết nhiều thay đổi trình tự riêng rẽ mà cải thiện ái lực của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b. Thử nghiệm cộng hưởng từ plasmon bề mặt đã thể hiện rằng mặc dùng không có các biến thể được thử nghiệm với các thay đổi HVR đơn có ái lực tương tự với MA79b, việc kết hợp các thay đổi được nhận biết trong HVR-L2 và HVR-H3 (biến thể L2/H3 kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b; cũng được gọi ở đây là huMA79b L2/H3) dẫn đến biến thể với ái lực tương tự (Fig. 11) như MA79b khi gắn kết với huCD79b$_{ecd}$ hoặc huCD79b$_{ecd}$-Fc được làm cố định hoặc peptit 16 axit amin chứa epitop đối với MA79b như được xác định bởi phân tích Biacore.

Phân tích monome gắn kết (Fab) trái với dime gắn kết (IgG) của MA79b với kháng nguyên (huCD79b$_{ecd}$-Fc) (Fig. 11, dãy 1, so sánh Fab với các cột IgG) đề xuất rằng hợp phần ái lực gấp 100 lần có mặt trong MA79b có thể thiếu các biến thể cải thiện ái lực. Đặc biệt là, trong biến thể L2-2 kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b L2-2 (ở đây cũng được gọi là huMA79b L2-2) mà chứng minh sự cải thiện gấp 5 lần trong monome gắn kết được so với MA79b (Fig. 11, dãy 1 và 3, so sánh các cột Fab), ái lực xuất hiện không khuếch đại ngay khi định dạng lại huMA79b L2-2 như IgG) (Fig. 11, dãy 4, so sánh Fab với các cột IgG). Ngoài ra, kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b HVR ban đầu (mảnh ghép huMA79b) chứng minh sự mất hợp phần ái lực này trong gắn kết (Fig. 11, dãy 2, so sánh Fab với các cột IgG). Khả năng làm tăng cường gắn kết thông qua ái lực có thể mong muốn trong gắn kết kháng nguyên bề mặt tế bào.

b. Xác định ái lực (phân tích Scatchard)

Như được đánh giá bởi phân tích Scatchard, phương pháp sửa chữa CDR xác định nhiều thay đổi trình tự riêng rẽ mà cải thiện ái lực của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b. Đặc biệt là, các thử nghiệm gắn kết tế bào thể hiện rằng ái lực của biến thể kháng thể L2/H3 MA79b và "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (huMA79b L2/H3) (được định dạng lại như IgG) để gắn kết tế bào BJAB biểu hiện ổn định xynomologous CD79b và CD79b nội sinh của người là với giá trị Kd là 0,63nM (MA79b; Kd = 0,63 ± 0,14 nM) và 0,52nM (huMA79b L2/H3; Kd = 0,52 ± 0,1nM), tương ứng (các dữ liệu không được thể hiện), như được xác định bởi phân tích Scatchard.

c. Xác định gắn kết (phân tích FACS)

Như được đánh giá bởi phân tích FACS, phương pháp sửa chữa CDR này xác định nhiều thay đổi trình tự riêng rẽ mà cải thiện sự gắn kết của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (mảnh ghép huMA79b) với tế bào DoHH-2 (các dữ liệu không được thể hiện). Đặc biệt là, phân tích FACS các biến thể Fab (các đột biến L2-2, H3-10 và H1-1) xác định từ các thư viện SP và 6 SR với tế bào DoHH-2 thể hiện sự gắn kết của các biến thể Fab và mảnh ghép huMA79b (được định dạng là IgG) với các tế bào DoHH-2 (các dữ liệu không được thể hiện). Hơn nữa, phân tích FACS các biến thể Fab thể hiện rằng sự gắn kết của các biến thể Fab với tế bào

DoHH-2 được phong bế bằng cách ủ trước với kháng thể đơn dòng kháng CD79b của chuột (MA79b) (các dữ liệu không được thể hiện).

2. Sửa chữa khung

Các thay đổi trình tự HVR được đưa vào HVR-L2 của biến thể huMA79b L2/H3 cơ bản là khác với các biến thể được quan sát ở dòng mầu bất kỳ của người. Biến thể huMA79b L2/H3, khi được liên hợp với DM1, được quan sát là có hiệu quả ức chế sự phát triển khối u ở mô hình ghép khác loại của chuột in vivo (Bảng 9). Do sự phân tích monome gắn kết (Fab) trái với dime gắn kết (IgG) của biến thể huMA79b L2/H3 với kháng nguyên thể hiện mất ái lực (Fig. 11), việc sửa chữ khung được thực hiện như được mô tả dưới đây.

Để nghiên cứu vai trò của các vị trí khung trong gắn kết kháng nguyên dime, biến thể "tất cả vị trí khung" được tạo cấu trúc trong đó các vị trí khung của chuột quan trọng hiệu lực được kết hợp vào kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b HVR (mảnh ghép huMA79b). Biến thể này (được đề cập trong Fig. 12 là "tất cả khung"), thiếu các thay đổi HVR bất kỳ, có ái lực gắn kết dime tương tự với kháng thể MA79b khảm (chMA79b) (Fig. 12) như được đánh giá bởi phân tích Biacore và phân tích Scatchard.

Trong các biến thể IgG, bao gồm các gốc khung của chuột ở các vị trí 4 và/hoặc 47 (VL) và/hoặc các vị trí 47, 48, 67, 69, 71, 73, 74, 78 và/hoặc 80 (VH) được sinh ra để xác định bộ tối thiểu của các vị trí khung cần để duy trì ái lực cao, gắn kết dime (Fig. 12). Các gốc khung của chuột được thể hiện trong các Fig. 7A-B (SEQ ID NO: 10) và các Fig. 8A-B (SEQ ID NO: 14). Các vị trí khung 47 trong VL, và 75 và 80 trong VH được phát hiện có thể không cần thiết như được chứng minh bởi biến thể kháng thể 17 "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (huMA79b.v17) (Fig. 12, dãy được đánh dấu là 17).

Biến thể kháng thể 18 "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (MA79b.v18; Fig. 12, dãy được đánh dấu là 18), mà bao gồm các gốc khung của chuột ở các vị trí 4 trong VL, và 48, 67, 69, 71, 73 và 78 trong VH và bao gồm các thay đổi khác trong HVR-H3 (được đề cập đến trong Fig. 12 như "H3-10" và được mô tả trên đây là H3-10 đột biến), bao gồm V98I, Y99R và F100L, thể hiện sự cải hiện gấp 2 lần bổ sung (Fig. 12, dãy được đánh dấu là 28)átong gắn kết dime khi được so với biến thể 17 (Fig. 12, dãy được đánh dấu là 17).

Để tránh đưa ra sản xuất hiệu lực, vị trí tạo axit iso-aspartic hiệu lực (Asp-Gly) trong HVR-L1 của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b được loại bỏ bằng cách biến đổi D28 thành Glu (axit glutamic) (D28E; xem biến thể 28; cũng được gọi ở đây là "huMA79b.v28"; Fig. 12, dãy được đánh dấu là 28). Thay thế khác để ổn định trong VL của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b cũng được dung nạp bao gồm D28 với Ser (serine) (D28E; xem biến thể 32; cũng được gọi ở đây là "huMA79b.v32"; Fig. 12, dãy được đánh dấu là 32).

Biến thể kháng thể 28 "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (huMA79b.v28; Fig. 12, dãy được đánh dấu là 28), mà bao gồm: (1) các gốc khung của chuột ở các vị trí 4 trong VL, và 48, 67, 69, 71, 73 và 78 trong VH, (2) bao gồm các thay đổi trong HVR-H3 (được đề cập đến trong Fig. 12 là "H3-10" và được mô tả trên đây như H3-10 đột biến), bao gồm V98I, Y99R và F100L, và (3) thậm chí còn bao gồm các thay đổi trong HVR-L1 (D28E, được mô tả trên đây) được đặc trưng qua phân tích Biacore.

Biến thể kháng thể 32 "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (MA79b.v32; Fig. 12, dãy được đánh dấu là 32), mà bao gồm: (1) các gốc khung của chuột ở các vị trí 4 trong VL, và 48, 67, 69, 71, 73 và 78 trong VH, (2) còn bao gồm các thay đổi trong HVR-H3 (được đề cập đến trong Fig. 12 là "H3-10" và được mô tả trên đây là H3-10 đột biến), bao gồm V98I, Y99R và F100L, và (3) thậm chí còn bao gồm các thay đổi trong HVR-L1 (D28S, được mô tả trên đây) được đặc trưng qua phân tích Biacore.

a. Xác định ái lực (phân tích Biacore)

Như được thể hiện trong Fig. 12, thể hiện phân tích Biacore, phương pháp sửa chữa khung này nhận biết nhiều thay đổi trình tự riêng rẽ mà cải thiện ái lực của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b với huCD79b$_{ecd}$. Các thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt thể hiện rằng biến thể kháng thể 28 "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (huMA79b.v28; với các vị trí khung của chuột 4 trong VL, 48, 67, 69, 71, 73 và 78 trong VH, cũng như đột biến H3-10 trong HVR-H3 (V98I, Y99R và F100L (cũng được mô tả trên đây) và đột biến D28E trong HVR-L1 (để ổn định, xem mô tả trên đây); Fig. 12, dãy được đánh dấu là 28) và biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (huMA79b.v32; với

các vị trí khung của chuột 4 trong VL, 47, 48, 67, 69, 71, 73 và 78 trong VH, cũng như đột biến H3-10 trong HVR-H3 (V98I, Y99R và F100L (cũng được mô tả trên đây) và đột biến D28S trong HVR-L1 (để ổn định, xem mô tả trên đây); Fig. 12, dãy được đánh dấu là 32) có ái lực tương tự với kháng thể MA79b khảm (chMA79b) khi gắn kết với huCD79b$_{ecd}$ được làm cố định như được xác định bởi phân tích Biacore.

b. Xác định ái lực (phân tích Scatchard)

Như được đánh giá bởi phân tích Scatchard, tương tự với phân tích Biacore, phương pháp sửa chữa khung này nhận biết nhiều thay đổi trình tự riêng rẽ mà cải thiện ái lực của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (mảnh ghép huMA79b). Các thử nghiệm gắn kết tế bào thể hiện rằng ái lực của MA79b, biến thể kháng thể 28 "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (huMA79b.v28; xem Fig. 12, dãy được đánh dấu là 28) (được định dạng lại là IgG), và biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 32 (huMA79b.v32; xem Fig. 12, dãy được đánh dấu là 32) để gắn kết tế bào BJAB biểu hiện ổn định xynomologous CD79b và CD79b nội sinh của người với giá trị Kd là 0,63 nM (MA79b; Kd = 0,63 ± 0,14 nM), 0,44 nM (huMA79b.v28; Kd = 0,44 ± 0,04 nM), và 0,24 nM (huMA79b.v32; Kd = 0,24 ± 0,02 nM), tương ứng (các dữ liệu không được thể hiện), như được xác định bởi phân tích Scatchard.

c. Xác định gắn kết (phân tích FACS)

Như được thử nghiệm bằng phân tích FACS, phương pháp sửa chữa khung này nhận biết nhiều thay đổi trình tự riêng rẽ mà cải thiện sự gắn kết của kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b (mảnh ghép huMA79b) với tế bào BJAB-luxiferaza (dữ liệu không được thể hiện). Đặc biệt là, phân tích FACS của các biến thể IgG của biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79bs (biến thể huMA79b.v28 và huMA79b.v32) với các tế bào BJAB-luxiferaza thể hiện sự gắn kết của tế bào BJAB-luxiferaza (dữ liệu không được thể hiện).

B. Mô tả sự tạo ra kháng thể được làm thích hợp với người kháng CD79b

Bắt đầu từ mảnh ghép 6 MA79b HVR của chuột (được xác định là các vị trí 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 26-35 (H1), 49-65 (H2) và 93-102 (H3)) vào Kappa I VL liên ứng của người và phân nhóm III VH (chứa A71, T73 và A78), sửa chữa CDR được sử dụng để nhận biết các thay đổi trong các HVR 1-6 mà cải thiện ái lực gắn kết. Các thay đổi trình tự HVR được nhận biết trong Fig. 10 và 11 hoặc các kết hợp của

các thay đổi này dẫn đến các biến thể được làm thích hợp với người của MA79b với ái lực tương tự với MA79b.

Theo cách khác, sửa chữa khung được sử dụng để bắt lại ái lực gắn kết dime bằng cách bổ sung các vị trí khung 4 trong VL, và 48, 67, và 69 trong VH vào mảnh ghép huMA79b (mà bao gồm các gốc khung của chuột ở 71, 73 và 78 của VH) (Fig. 12; biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 17 (huMA79b.v17)). Ái lực của các biến thể đột biến khung này đối với kháng nguyên huCD79b$_{ecd}$ còn được tăng cường bằng cách bổ sung 3 thay đổi trong HVR-H3: V98I, Y99R và F100L (Fig. 12; biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 18 (huMA79b.v18)). Vị trí tạo thành axit iso-aspartic hiệu lực trong HVR-L1 được loại bỏ với đột biến D28E (Fig. 12; biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 28 (huMA79b.v28)).

Ví dụ 2: Tạo ra các thể liên hợp kháng thể kháng CD79b dược chất (các ADC)

Để thử nghiệm hiệu quả của các biến thể IgG của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b, các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b được liên hợp với các dược chất như DM1. Các biến thể này được liên hợp với DM1 bao gồm các biến thể có các thay đổi trong HVR-L2 và HVR-H3 (huMA79b L2/H3), huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 và huMA79b.v32.

Các dược chất được sử dụng để sinh ra các thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) đối với các kháng thể kháng CD79b bao gồm maytansinoit DM1 và có thể bao gồm các dẫn xuất dolastatin10 monometylauristatin E (MMAE) và monometylauristatin F (MMAF). (US 2005/0276812; US 2005/0238649; Doronina et al., *Bioconjug. Chem.,* 17:114-123 (2006); Doronina et al., *Nat. Biotechnol.,* 21: 778-784 (2003); Erickson et al., *Cancer Res.,* 66: 4426-4433 (2006)). Các cầu liên kết hữu ích để sinh ra các ADC là BMPEO, SPP hoặc SMCC (cũng được gọi ở đây là "MCC") đối với DM1 và MC hoặc MC-vc-PAB đối với MMAE và MMAF. Đối với DM1, các kháng thể được liên kết với nhóm thio của DM1 và thông qua nhóm e-amino của lysin bằng cách sử dụng chất phản ứng cầu liên kết SMCC. Theo cách khác, đối với DM1, các kháng thể được liên kết với DM1 thông qua nhóm e-amino của lysin bằng cách sử dụng cầu liên kết SPP. SPP (N-sucxinimidyl 4-(2'-pyridldithio) pentanoat) phản ứng với nhóm epsilon amino của lysin để loại bỏ cầu liên kết 2-pyridyl disulfua phản ứng

trên protein. Với các cầu liên kết SPP, ngay khi phản ứng với sulfhydral tự do (ví dụ DM1), nhóm pyridyl được cắt, laọi bỏ DM1 được gắn kết qua liên kết disulfua có thể khử. DM1 được gắn vào qua cầu liên kết SPP được giải phóng dưới các điều kiện khử (nghĩa là, ví dụ, trong tế bào) trong khi DM1 được gắn vào qua cầu liên kết SMCC là kháng với việc loại bỏ trong các điều kiện khử. Hơn nữa, SMCC-DM1 ADC gây độc tố tế bào nếu ADC là được tiếp nhận và tạo đích với lysosom gây nên giải phóng lysin-N-DM1, là chất chống giãn phân hiệu quả trong tế bào và sau đó được giải phóng khỏi tế bào, lysin-N-DM1 là không độc (Erickson et al., *Cancer Res.,* 66: 4426-4433 (2006)). Đối với MMAE và MMAF, các kháng thể này được liên kết với MMAE hoặc MMAF thông qua xystein bởi maleeimidocaproyl-valin-xitrulin (vc)-p-aminobenzyloxycarbonyl (MC-vc-PAB). Đối với MMAF, các kháng thể được liên kết khác nhau với MMAF thông qua xystein bởi cầu liên kết maleeimidocaproyl (MC). Cầu liên kết MC-vc-PAB có thể được loại bỏ bởi proteaza nội bào như cathepsin B và khi được tách, giải phóng dược chất tự do (Doronina et al., *Nat. Biotechnol.,* 21: 778-784 (2003)) trong khi cầu liên kết MC là kháng với sự phân tách bởi proteaza nội bào.

Các thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) đối với kháng CD79b, bằng cách sử dụng SMCC và DM1, được sinh ra tương tự với quy trình được mô tả trong US 2005/0276812. kháng thể được tinh chế kháng CD79b được trao đổi chất đệm vào dung dịch chứa 50mM kali phosphat và 2mM EDTA, độ pH = 7,0. SMCC (Pierce Biotechnology, Rockford, IL) được hoà tan trong dimetylaxetamit (DMA) và được bổ sung vào dung dịch kháng thể để tạo tỷ lệ mol cuối cùng SMCC/Ab là 10:1. Phản ứng được cho phép thực hiện trong ba giờ ở nhiệt độ trong phòng kèm trộn. kháng thể được cải biến SMCC được tinh chế sau đó trên cột khử muối GE Healthcare HiTrap (G-25) được làm cân bằng trong 35mM natri xitrat với 150 mM NaCl và 2 mM EDTA, độ pH = 6,0. DM1, được hoà tan trong DMA, được bổ sung vào chế phẩm kháng thể SMCC để thu được tỷ lệ cuối cùng của DM1 với kháng thể là 10:1. Phản ứng này được cho phép diễn ra trong 4-20 giờ ở nhiệt độ trong phòng kèm trộn. Dung dịch kháng thể được cải biến DM1 được lọc thẩm tách với 20 thể tích PBS để loại bỏ DM1 không được phản ứng, lọc tiệt trùng và được bảo quản ở 4°C. Thôn tường, hiệu xuất 40-60% kháng thể đạt được thông qua quy trình này. Chế phẩm thường >95% monome như được đánh giá bằng cách lọc gel chiếu sáng lade. Do DM1 có sự bám dính tối đa ở 252 nm, lượng dược chất được gắn kết với kháng thể có thể được xác định bằng cách xác

định bám dính khác nhau ở 252 và 280nm. Thông thường, tỷ lệ dược chất với kháng thể là từ 3 đến 4.

Các thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) đối với các kháng thể kháng CD79b được mô tả ở đây bằng cách sử dụng các cầu liên kết SPP-DM1 có thể được sinh ra tương tự với quy trình được mô tả trong US 2005/0276812. Các kháng thể được tinh chế kháng CD79b được trao đổi chất đệm vào dung dịch chứa 50mM kali phosphat và 2mM EDTA, độ pH = 7,0 SPP (Immunogen) được hoà tan trong DMA và được bổ sung vào dung dịch kháng thể để tạo thành tỷ lệ mol SPP/Ab cuối cùng là khoảng 10:1, tỷ lệ dịch chiết phụ thuộc vào lượng dược chất mong muốn của kháng thể. Tỷ lệ 10:1 sẽ thường dẫn đến tỷ lệ dược chất với kháng thể là khoảng 3-4. SPP được cho phản ứng trong 3-4 giờ ở nhiệt độ trong phòng kèm trộn. kháng thể được cải biến SPP được tinh chế tiếp trên cột khử muối GE Healthcare HiTrap (G-25) được làm cân bằng trong 35mM natri xitrat với 150mM NaCl và 2mM EDTA, độ pH = 6,0 hoặc nước muối đệm phosphat, độ pH = 7,4. DM1 được hoà tan trong DMA và được bổ sung vào chế phẩm kháng thể SPP để thu được tỷ lệ mol của DM1 với kháng thể là 10:1, mà dẫn đến lượng dư mol đến 3-4 lần trong các cầu liên kết SPP hiện có trên kháng thể. Phản ứng với DM1 cho phép diễn ra trong 4-20 giờ ở nhiệt độ trong phòng kèm trộn. Dung dịch kháng thể được cải biến DM1 được lọc khử với 20 thể tích PBS để loại bỏ DM1 không được phản ứng, lọc tiệt trùng và được bảo quản ở 4°C. Thông thường, hiệu xuất của kháng thể là 40-60% hoặc lớn hơn đạt được với quy trình này. Thể liên hợp kháng thể-dược chất thường >95% monome như được đánh giá bởi sự lọc gel và chiếu sáng lade. Lượng dược chất được gắn kết được xác định bằng cách xác định hấp thu khác nhau ở 252 và 280nm như được mô tả để sản xuất liên hợp SMCC-DM1 (được mô tả trên đây).

Các thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) đối với kháng kháng thể kháng CD79b được mô tả ở đây bằng cách sử dụng các cầu liên kết dược chất MC-MMAF, MC-MMAE, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE hoặc MC-val-cit (vc)-PAB-MMAF cũng có thể được sinh ra tương tự với quy trình được mô tả trong US 2005/0238649. kháng thể kháng CD79b được tinh chế được hoà tan trong 500mM natri borat và 500mM natri clorua ở độ pH = 8,0 và xử lý tiếp với lượng dư 100MM dithiothreitol (DTT). Sau khi ủ ở 37°C trong khoảng 30 phút, chất đệm được trao đổi bằng cách tách rửa qua nhựa Sephadex G25 và được tách rửa với PBS với 1mM DTPA. Giá trị thiol/Ab được

kiểm tra bằng cách xác định nồng độ kháng thể giảm từ sự bức xạ ở 280nm dung dịch và nồng độ thiol bằng phản ứng với DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) và xác định sự bức xạ ở 412nm. kháng thể khử được hoà tan trong PBS được làm lạnh trên đá lạnh. Cầu liên kết dược chất, ví dụ, MC-val-cit (vc)-PAB-MMAE, trong DMSO, được hoà tan trong axetonitril và nước và được bổ sung vào kháng thể khử được làm lạnh trong PBS. Sau một giờ ủ, lượng dư maleimit được bổ sung vào để làm ngừng phản ứng và nắp các nhóm thiol kháng thể không được phản ứng bất kỳ. Hỗn hợp phản ứng được cô đặc bằng cách siêu lọc ly tâm và thể liên hợp kháng thể-dược chất được tinh chế và được khử muốn bằng cách tách rửa qua nhựa G25 trong PBS, lọc qua 0,2mm chất lọc dưới các điều kiện tiệt trùng và làm đông lạnh để bảo quản.

Các thể liên hợp kháng thể-dược chất (bằng cách sử dụng các kháng thể kháng CD79b được mô tả ở đây) được pha loãng ở 2 x 10mg/ml trong môi trường thử nghiệm. Các thể liên hợp được liên kết với cầu liên kết ngang SMCC (cầu liên kết disulfua khác có thể được sử dụng đối với SPP với độc tố maytansinoit DM1) (Xem US 2005/0276812 và US 2005/0238649). Ngoài ra, các thể liên hợp có thể được liên kết với MC-valin-xitrulin (vc)-PAB hoặc MC với các dẫn xuất dolastatin10, độc tố monometylauristatin E (MMAE) hoặc độc tố monometylauristatin F (MMAF) (Xem đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 11/141,344, nộp ngày 31/5/2005 và đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 10/983,340, nộp ngày 5/11/2004). Các đối chứng âm bao gồm HERCEPTIN® (trastuzumab) (kháng HER2) dựa trên các thể liên hợp (SMCC-DM1 hoặc SPP-DM1 hoặc MC-vc-MMAE hoặc MC-vc-MMAF). Các đối chứng dương có thể bao gồm L-DM1 tự do tương đương với liều lượng liên hợp. Các mẫu được thổi để đảm bảo rằng hỗn hợp đồng nhất trước khi pha loãng.

Các kháng thể kháng CD79b đối với thể liên hợp dược chất bao gồm các kháng thể khảm MA79b (chMA79b) và biến thể kháng thể huMA79b L2/H3 và huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 và huMA79b.v32 được mô tả ở đây (xem Ví dụ 1). Các kháng thể khác để liên hợp có thể bao gồm các kháng thể bất kỳ được mô tả ở đây (xem Ví dụ 1).

Ví dụ 3: Thử nghiệm giết chế tế bào khối u in vivo

A. Mảnh ghép khác loại

Để thử nghiệm hiệu quả của các biến thể IgG của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b có các thay đổi ở HVR-L2 và HVR-H3 (huMA79b L2/H3), biến thể huMA79b L2/H3 được liên hợp với DM1 và hiệu quả của biến thể được liên hợp đối với khối u ở chuột được phân tích.

Đặc biệt là, khả năng của kháng thể làm thoái biến khối u ở nhiều mô hình ghép khác loại, bao gồm các tế bào RAMOS, các tế bào BJAB (dòng tế bào u lympho Burkitt mà chứa sự hoán vị t(2;8)(p112;q24) (IGK-MYC), gen p53 được đột biến và là Epstein-Barr virút (EBV) âm) (Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book,* San Diego: Academic Press, 2001)), các tế bào Granta 519 (dòng tế bào u lympho tế bào vỏ chứa sự hoán vị t(11;14)(q13;q32) (BCL1-IGH) mà dẫn đến sự biểu hiện quá mức của xyclin D1 (BCL1), chứa P16INK4B và loại bỏ P16INK4A và là EBV dương) (Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book,* San Diego: Academic Press, 2001)), các tế bào U698M (dòng tế bào khối u bạch cầu bạch huyết tế bào B; (Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book,* San Diego: Academic Press, 2001) và các tế bào DoHH2 (dòng tế bào u lympho dạng nang mà chứa đặc trưng hoán vị của u lympho dạng nang t(14;18)(q32;q21) mà dẫn đến biểu hiện quá mức Bcl-2 được điều khiển bởi chuỗi nặng Ig, chứa sự loại bỏ P16INK4Am, chứa sự hoán vị t(8;14)(q24;q32) (IGH-MYC) và là EBV âm) (Drexler, H.G., *The Leukemia-Lymphoma Cell Line Facts Book,* San Diego: Academic Press, 2001)), có thể được thử nghiệm.

Để phân tích hiệu quả của các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b, chuột cái CB17 ICR SCID (6-8 tuần tuổi từ Charles Rivers Laboratories; Hollister, CA) được cấy dưới da với 2 X 10^7 tế bào BJAB-luxiferaza hoặc tế bào Granta-519 qua tiêm vào hông của chuột CB17 ICR SCID và các khối u ghép khác loại được cho phép phát triển đến trung bình là 200mm^2. Ngày 0 đề cập đến ngày khối u có trung bình là 200mm^2 và khi liều thứ nhất/hoặc điều trị được dùng, trừ phi có quy định cụ thể dưới đây. Thể tích khối u được tính toán dựa trên hai kích thước, được xác định bằng cách sử dụng compa và được biểu hiện theo mm^3 theo công thức: $V= 0,5a X b^2$, trong đó a và b là chiều dài và đường kính ngăn của khối u, tương ứng. Các dữ liệu được gom từ mỗi nhóm thử nghiệm được biểu hiện là trung bình + SE. Các nhóm gồm 10 chuột được điều trị với liều tĩnh mạch đơn (i.v.) nằm trong khoảng từ 50 đến 210mg kháng thể được liên kết dược chất/m^2 chuột (tương ứng với khoảng 1-

4 mg/kg chuột) với các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b hoặc các thể liên hợp kháng thể-dược chất đối chứng. Các khối u được xác định một lần hoặc hai lần một tuần trong toàn bộ thử nghiệm. Thể trọng của chuột được xác định một lần hoặc hai lần một tuần trong toàn bộ thử nghiệm. Chuột được gây mê trước khi thể tích khối u đạt đến 3000mm^3 hoặc khi khối u thể hiện các dấu hiệu của sự viêm loét sắp xảy ra. Tất cả quy trình động vật được chấp thuận bởi Institutional Animal Care and Use Committee (IACUC).

Các cầu liên kết giữa kháng thể và độc tố mà được sử dụng là cầu liên kết ngang thioete SMCC đối với DM1. Các cầu liên kết bổ sung có thể bao gồm cầu liên kết disulfua SPP hoặc cầu liên kết ngang thioete SMCC đối với DM1 hoặc MC hoặc MC-valin-xitrulin(vc)-PAB hoặc chất phản ứng cầu liên kết (valin-xitrulin (vc)) dipeptit) có hợp phần maleimit và hợp phần tự chết para-aminobenzylcarbamoyl (PAB) đối với monometylauristatin E (MMAE) hoặc monometylauristan F (MMAF). Các chất độc được sử dụng là DM1. Các chất độc bổ sung có thể bao gồm MMAE hoặc MMAF.

Các kháng thể CD79b đối với thử nghiệm này bao gồm các kháng thể khảm MA79v (chMA79b) như được mô tả trong đơn yêu cầu cấp bằng Mỹ số 11/462,336, nộp ngày 3/8/2006 cũng như các biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b được mô tả ở đây (xem Ví dụ 1). Các kháng thể bổ sung có thể bao gồm các kháng thể hiện có bán trên thị trường, bao gồm kháng thể kháng MA79b và các kháng thể đơn dòng MA79b được sinh ra từ thể lai được lưu giữ với ATCC như HB11413 ngày 20/7/1993.

Các đối chứng âm bao gồm kháng HER2 (HERCEPTIN® (trastuzumab)) dựa trên liên hợp (SMCC-DM1).

B. Kết quả

1. BJAB-mảnh ghép khác loại luxiferaza

Trong khoảng thời gian 35 ngày với thể liên hợp dược chất và các liều được thể hiện trong Bảng 9, biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b L2/H3 (biến thể huMA79b L2/H3) (được định dạng lại là IgG) và kháng thể khảm kháng CD79b (chMA79b) được liên hợp với DM1 (huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 và chMA79b-SMCC-DM1, tương ứng), thể hiện sự ức chế phát triển khối u ở chuột SCID với khối u BJAB-luxiferaza được so với đối chứng âm, HERCEPTIN®

(trastuzumab)-SMCC-DM1 (kháng HER2-SMCC-DM1). Các ADC được dùng theo liều đơn (như được nêu trong Bảng 9) ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng. Đặc biệt là, các kháng thể huMA79b L2/H3-SMCC-DM1 (được định dạng lại là IgG) và chMA79b–SMCC-DM1 ức chế đáng kể sự phát triển khối u (Fig. 20). Hơn nữa, trong Bảng 9, số lượng chuột ngoài tổng số chuột được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu.

Bảng 9

Kháng thể được dùng (Điều trị)	**PR**	**CR**	**Liều dược chất - DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**Tỷ lệ dược chất (Dược chất/Ab)**
Đối chứng kháng HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	100	2	3,3
chMA79b-SMCC-DM1	3/10	3/10	100	2,4	2,9
chMA79b-SMCC-DM1	1/10	0/10	50	1,2	2,9
huMA79b L2/H3-SMCC-DM1	2/10	0/10	100	2,9	2,4
huMA79b L2/H3-SMCC-DM1	0/10	0/10	50	1,4	2,4

2. Ghép khác loại Granta-519

Trong tiến trình 14 ngày với các thể liên hợp dược chất và các liều được thể hiện trong Bảng 10, biến thể kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b 17, biến thể 18, biến thể 28 và biến thể 32 (huMA79b.v17, huMA79b.v18, huMA79b.v28 và huMA79b.v32, tương ứng) (được định dạng lại là IgG) và kháng thể khảm kháng CD79b (chMA79b) được liên hợp với DM1 (huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1, huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1 và chMA79b-SMCC-DM1, tương ứng), thể hiện sự ức chế phát triển khối u ở chuột SCID với khối u Granta-519 được so với đối chứng âm, HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (kháng HER2-SMCC-DM1). Các ADC được dùng theo liều đơn (như được nêu trong Bảng 10) ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng. ĐẶc biệt là, các kháng thể huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1 và huMA79b.v18-SMCC-DM1 (được định dạng lại là IgG) và chMA79b–SMCC-DM1 ức chế đáng kể sự phát triển khối u (Fig. 21A).

Hơn nữa, việc điều trị với huMA79b.v28-SMCC-DM1, huMA79b.v32-SMCC-DM1, huMA79b.v17-SMCC-DM1, huMA79b.v18-SMCC-DM1 và chMA79b-SMCC-DM1 và đối chứng HERCEPTIN® (trastuzumab)-SMCC-DM1 (kháng HER2-SMCC-DM1) không dẫn đến làm giảm phần trăm thể trọng của chuột (Fig. 21B). Còn ngoài ra, trong Bảng 10, số lượng chuột ngoài tổng số chuột được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu.

Bảng 10

Kháng thể được dùng (Điều trị)	**PR**	**CR**	**Liều dược chất - DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**Tỷ lệ dược chất (Dược chất/Ab)**
Đối chứng kháng HER2-SMCC-DM1	0/10	0/10	208	4	3,4
chMA79b-SMCC-DM1	0/10	0/10	107	2	3,6
chMA79b-SMCC-DM1	1/10	0/10	213	4	3,6
huMA79b.v17-SMCC-DM1	0/10	0/10	202	4	3,4
huMA79b.v18-SMCC-DM1	4/10	0/10	196	4	3,3
huMA79b.v28-SMCC-DM1	0/10	0/10	101	2	3,4
huMA79b.v28-SMCC-DM1	2/10	2/10	202	4	3,4
huMA79b.v32-SMCC-DM1	0/10	0/10	172	4	2,9

Theo quan điểm về khả năng của các ADC kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b để ức chế đáng kể sự thoái biến khối u ở mảnh ghép khác loại, các phân tử CD79b có thể tạo đích tốt để điều trị khối u ở động vật có vú, bao gồm các bệnh ung thư liên quan đến tế bào B, như u lympho (nghĩa là u lympho không Hodgkin), bệnh bạch cầu (nghĩa là bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính) và các bệnh ung thư khác của tế bào tạo huyết. Hơn nữa, các ADC "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b là hữu ích để giảm sự phát triển khối u của khối u in vivo, bao gồm các bệnh ung thư liên quan đến tế bào B, như u lympho (nghĩa là u lympho không Hodgkin), bệnh bạch cầu (nghĩa là bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính) và các bệnh ung thư khác của tế bào tạo huyết.

Ví dụ 4: Cùng định vị kháng thể CD79b

Để xác định các kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b và các biến thể được phân páht ngay khi tiếp nhận vào tế bào, các nghiên cứu cùng định vị của các kháng thể kháng CD79b được nhận vào các dòng tế bào B có thể được đánh giá ở các dòng tế bào Ramos. LAMP-1 là chất đánh dấu đối với endosom sau và lysosom (Kleijmeer et al., *Journal of Cell Biology,* 139(3): 639-649 (1997); Hunziker et al., *Bioessays,* 18:379-389 (1996); Mellman et al., *Annu. Rev. Dev. Biology,* 12:575-625 (1996)), bao gồm các ngăn lớp II MHC (MIIC), mà ngăn tương tự endosom sau/lysom. HLA-DM là chất đánh dấu đối với MIIC.

Các tế bào Ramos được ủ trong 3 giờ ở 37°C với 1μg/ml kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b và các biến thể kháng thể, FcR phng bế (Miltenyi) và 25μg/ml Alexa647-Transferrin (Molecular Probes) trong môi trường hoàn toàn không chứa carbonat (Gibco) với sự có mặt của 10μg/ml leupeptin (Roche) và 5μM pepstatin (Roche) để ức chế sự thoái biến lysosm. Sau đó, rửa tế bào hai lần, được cố định với 3% paraformaldehyt (Electron Microscopy Sciences) trong 20 phút ở nhiệt độ trong phòng, được làm ngừng với 50mM NH4Cl (Sigma), được thấm với 0,4% Saponin/2% FBS/1% BSA trong 20 phút và sau đó được ủ với 1μg/ml Cy3 kháng chuột (Jackson Immunoresearch) trong 20 phút. Sau đó, phản ứng này được phong bế trong 20 phút với IgG của chuột (Molecular Probes), tiếp theo bởi ủ 30 phút với Image-iT FX Signal Enhancer (Molecular Probes). Cuối cùng, ủ tế bào với kháng LAMP1 của chuột được đánh dấu Zenon Alexa488 LAMP1 (BD Pharmingen), chất đánh dấu đối với lysosom và MIIC (ngăn tương tự lysosom mà là một phần của con đường lớp II MHC), trong 20 phút và được cố định sau với 3% PFA. Tạo huyền phù tế bào trong 20μl chất đệm saponin và cho phép bám dính với tấm kính được bọc ngoài poly-lysin (Sigma) trước khi gắn toàn bộ tấm kính với DAPI-chứa VectaShield (Vector Laboratories). Để phát huỳnh quang miễn dịch MIIC hoặc lysosom, tế bào được cố định, thấm và tăng cường như trên, sau đó cùng nhuộm với Zenon được đánh dấu Alexa555-HLA-DM (BD Pharmingen) và Alexa488-Lamp1 với sự có mặt của lượng dư IgG của chuột như trên hướng dẫn của nhà sản xuất (Molecular Probes).

Do đó, việc cùng định vị các kháng thể "được làm thích hợp với người" được ghép MA79b hoặc các biến thể kháng thể với MIIC hoặc lysosom của dòng tế bào B như được đánh giá bởi huỳnh quang miễn dịch có thể cho biết các phân tử như chất tốt

để điều trị khối u ở động vật có vú, bao gồm các bệnh ung thư liên quan đến tế bào B, như u lympho (nghĩa là u lympho không Hodgkin), bệnh bạch cầu (nghĩa là bệnh bạch cầu tế bào lympho mạn tính) và các bệnh ung thư khác của tế bào tạo huyết.

Ví dụ 5: Sản xuất các kháng thể kháng CD79b sinh xystein

Sản xuất kháng thể kháng CD79b sinh xystein được thực hiện như được mô tả ở đây.

ADN mã hoá kháng thể MA79b (chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 4, Fig. 4; và chuỗi nặng, SEQ ID NO: 5, Fig. 5), được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. ADN mã hoá kháng thể MA79b (chuỗi nặng, SEQ ID NO: 5; Fig. 5) cũng có thể được đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến vùng Fc của chuỗi nặng.

ADN mã hoá kháng thể huMA79b.v17 (chuỗi nặng, SEQ ID NO: 304, Fig. 15) được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nặng. ADN mã hoá kháng thể huMA79b.v17 (chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 303; Fig. 15; và chuỗi nặng, SEQ ID NO: 304; Fig. 15), cũng có thể được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nhẹ hoặc vùng Fc của chuỗi nặng.

ADN mã hoá kháng thể huMA79b.v18 (chuỗi nặng, SEQ ID NO: 306, Fig. 16) được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nặng. ADN mã hoá kháng thể huMA79b.v18 (chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 305; Fig. 16; và chuỗi nặng, SEQ ID NO: 306; Fig. 16), cũng có thể được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nhẹ hoặc vùng Fc của chuột nặng.

ADN mã hoá kháng thể huMA79b.v28 (chuỗi nặng, SEQ ID NO: 308, Fig. 17), được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nặng. ADN mã hoá kháng thể huMA79b.v28 (chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 307, Fig .17; và chuỗi nặng, SEQ ID NO: 308, Fig. 17), cũng có thể được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nhẹ hoặc vùng Fc của chuỗi nặng.

ADN mã hoá kháng thể huMA79b.v32 (chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 310, Fig. 18; và chuỗi nặng, SEQ ID NO: 309, Fig. 18) có thể được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nhẹ và chuỗi nặng.

ADN mã hoá kháng thể kháng xyno CD79b (chuỗi nhẹ, SEQ ID NO: 241; Fig. 45 và chuỗi nặng, SEQ ID NO: 243, Fig. 47), được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến chuỗi nhẹ và chuỗi nặng. ADN mã hoá kháng thể kháng xyno CD79b (chuỗi nặng, SEQ ID NO: 243, Fig. 47), cũng có thể được tạo đột biến gen bằng các phương pháp được mô tả ở đây để cải biến vùng Fc của chuỗi nặng.

Trong sản xuất kháng thể kháng CD79b sinh xystein, ADN mã hoá chuỗi nhẹ được tạo đột biến gen để thay thế xystein đối với valin ở vị trí Kabat 205 trong chuỗi nhẹ (vị trí trình tự 209) như được thể hiện trong Fig. 27 (chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 235 của MA79b thioMAb) và Fig. 49 (chuỗi nhẹ SEQ ID NO: 300 của thioMAb kháng-xynoCD79b (ch10D10)). ADN mã hoá chuỗi nặng được tạo đột biến gen để thay thế xystein đối với alanin ở vị trí EU 118 trong chuỗi nặng (vị trí trình tự 118; số Kabat 114) như được thể hiện trong Fig. 48 (chuỗi nặng SEQ ID NO: 244 của kháng thể thioMAb kháng xyno CD79b (ch10D10)), Fig. 28 (chuỗi nặng SEQ ID NO: 236 của MA79b thioMAb), Fig. 24 (chuỗi nặng SEQ ID NO: 228 của thioMAb huMA79b.v17), Fig. 25 (chuỗi nặng SEQ ID NO: 230 của thioMAb huMA79b.v18) và trong Fig. 26 (chuỗi nặng SEQ ID NO: 232 của thioMAb huMA79b.v28). Vùng Fc của kháng thể kháng CD79b có thể được tạo đột biến gen để thay thế xystein đối với serin ở vị trí EU 400 ở vùng Fc chuỗi nặng (vị trí trình tự 400; số Kabat 396) như được thể hiện trong Bảng 2-4.

A. Sản xuất kháng thể kháng CD79b sinh xystein để liên hợp bằng cách khử và oxy hoá khử

Toàn bộ chiều dài, các kháng thể đơn dòng kháng CD79b sinh xystein (ThioMabs) được biểu hiện ở tế bào CHO và được tinh chế trên sắc ký ái lực protein A tiếp theo bởi sắc ký ngoại cỡ. Các kháng thể được tinh chế được cấu trúc lại trong 500mM natri borat và 500mM natri clorua ở độ pH = 8,0 và được giảm với khoảng 50-100 lần lượng dư 1mM TCEP (tris(2-carboxyetyl)phosphin hydroclorua; Getz et al (1999) Anal. Biochem. Vol 273:73-80; Soltec Ventures, Beverly, MA) trong khoảng 1-2 giờ ở 37°C. ThioMab được khử được pha loãng và được nạp vào cột HiTrap S trong 10mM natri axetat, độ pH = 5, và được tách rửa với PBS chứa 0,3M natri clorua. ThioMab được khử được tách rửa được xử lý với 2mM axit dehydroascorbic (dhAA) ở độ pH = 7 trong 3 giờ hoặc 2mM đồng sulfat trong nước ($CuSO_4$) ở nhiệt độ trong

phòng qua đêm. Oxy hoá không khí môi trường cũng có thể có hiệu quả. Chiết chất đệm bằng cách tách rửa qua nhựa Sephadex G25 và được tách rửa với PBS với 1mM DTPA. Giá trị thiol/Ab được đánh giá bằng cách xác định nồng độ kháng thể giảm từ sự bám dính ở 280nm dung dịch và nồng độ thiol bằng cách phản ứng với DTNB (Aldrich, Milwaukee, WI) và xác định sự bám dính ở 412nm.

Ví dụ 6: Sản xuất liên hợp kháng thể kháng CD79b sinh xystein dược chất bằng sự thể liên hợp của kháng thể kháng CD79b sinh xystein và chất trung gian dược chất-cầu liên kết

Sau quy trình khử và oxy hoá của Ví dụ 5, kháng thể kháng CD79b sinh xystein được cấu trúc lại trong chất đệm PBS (nước muối đệm phosphat) và được làm lạnh trên đá lạnh. Khoảng 1,5 đương lượng mol liên quan đến xystein được sinh ra/kháng thể chứa chất trung gian dược chất cầu liên kết auristatin, như MC-MMAE (maleimidocaproyl-monometyl auristatin E), MC-MMAF, MC-val-cit-PAB-MMAE hoặc MC-val-cit-PAB-MMAF, với nhóm chức phản ứng thiol như maleimido, được hoà tan trong DMSO, được pha loãng trong axetonitril và nước và được bổ sung vào kháng thể được khử được làm lạnh được oxy hoá lại trong PBS. Sau khoảng một giờ, lượng dư maleimit được bổ sung vào để làm ngừng phản ứng và nắp các nhóm thiol kháng thể không được phản ứng bất kỳ. Cô đặc hỗn hợp phản ứng bằng cách siêu lọc ly tâm và liên hợp kháng thể kháng CD79b sinh xystein dược chất được tinh chế và được khử muối bằng cách tách rửa qua nhựa G25 trong PBS, được lọc qua 0,2µm chất lọc dưới các điều kiện tiệt trùng và được làm đông lạnh để bảo quản.

Việc sản xuất huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb-BMPEO-DM1 có thể được thực hiện như sau. Xystein tự do trên huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb được cải biến bởi chất phản ứng bis-maleimido BM(PEO)3 (Pierce Chemical), tách nhóm maleimido không được phản ứng trên bề mặt của kháng thể. Điều này được kết thúc bằng cách hoà tan BM(PEO)3 trong 50% hỗn hợp etanol/nước đến nồng độ là 10mM và thêm lượng dư mol gấp mười lần của BM(PEO)3 vào dung dịch chứa huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb trong nước muối được đệm phosphat ở nồng độ khoảng 1,6mg/ml (10 micromol) và cho phép nó phản ứng trong 1 giờ. BM(PEO)3 dư được loại bỏ bằng cách lọc gel (cột HiTrap, Pharmacia) trong 30mM xitrat, độ pH = 6 với 150mM chất đệm NaCl. Lượng dư khoảng 10 lần DM1 được hoà tan trong dimetyl

axetamit (DMA) được bổ sung vào chất trung gian huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb-BMPEO. Dimetylformamit (DMF) cũng có thể được dùng để hoà tan chất phản ứng phần dược chất. Hỗn hợp phản ứng được cho phản ứng qua đêm trước khi lọc gel hoặc thẩm tách vào PBS để loại bỏ dược chất không phản ứng. Lọc gel trên cột S200 trong PBS được sử dụng để loại bỏ chất kết tụ phân tử lượng cao và được tinh chế huMA79b.v18-HC(A118C) thioMAb-BMPEO-DM1.

Theo quy trình tương tự, thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio đối chứngl hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE và thio đối chứng kháng CD22-HC(A118C)-MC-MMAF được sinh ra.

Theo quy trình trên đây, các thể liên hợp kháng thể kháng CD79b sinh xystein dược chất (TDC) sau đây được sản xuất và được thử nghiệm:

1. thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF theo sự liên hợp của A118C thio huMA79b.v18-HC(A118C) và MC-MMAF;

2. thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 theo sự liên hợp của A118C thio huMA79b.v18-HC(A118C) và BMPEO-DM1;

3. thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE theo sự liên hợp của A118C thio huMA79b.v18-HC(A118C) và MC-val-cit-PAB-MMAE;

4. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF theo sự liên hợp của A118C thio huMA79b.v28–HC(A118C) và MC-MMAF;

5. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 theo sự liên hợp của thio huMA79b.v28–HC(A118C) và BMPEO-DM1;

6. thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-val-cit-PAB-MMAE theo sự liên hợp của thio huMA79b.v28–HC(A118C) và MC-val-cit-PAB-MMAE;

7. thio kháng-xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF theo sự liên hợp của A118C thio anti-xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) và MC-MMAF;

8. thio kháng-xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 theo sự liên hợp của A118C thio anti-xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) và BMPEO-DM1;

9. thio kháng-xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE theo sự liên hợp của A118C thio anti-xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) và MC-val-cit-PAB-MMAE;

10. thio MA79b-HC(A118C)-MC-MMAF theo sự liên hợp của thio MA79b-HC(A118C) và MC-MMAF; và

11. thio MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF theo sự liên hợp của thio MA79b-LC(V205C) và MC-MMAF.

Ví dụ 7: Đặc trưng của ái lực gắn kết của các thể liên hợp ThioMAb dược chất sinh xystein với kháng nguyên bề mặt tế bào

Ái lực gắn kết của thio huMA79b.v18, các thể liên hợp dược chất thio huMA79b.v28 và các thể liên hợp dược chất thio MA79b với CD79b được biểu hiện trên các tế bào BJAB-luxiferaza được xác định bởi phân tích FACS. Hơn nữa, ái lực gắn kết của các thể liên hợp dược chất thio kháng-xynoCD79b(ch10D10) với CD79b được biểu hiện trên tế bào BJAB biểu hiện xynoCD79b được xác định bởi phân tích FACS.

Một cách vắn tắt, khoảng $1x10^6$ tế bào trong 100µl được tiếp xúc với lượng thay đổi (1,0µg, 01 µg hoặc 0,01µg Ab/triệu tế bào của tế bào BJAB-luxiferaza hoặc các tế bào BJAB biểu hiện xynoCD79b (đối với kháng xynoCD79b thioMAbs)) của một trong số các thể liên hợp dược chất kháng CD79b thioMAb sau đây hoặc trần (Ab không được liên hợp làm đối chứng): (1) thio MA79b-LC(V205C)-MC-MMAF hoặc (2) thio MA79b-HC(A118C)-MC-MMAF (Fig. 29A-B, tương ứng); (3) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF, (4) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-vcPAB-MMAE hoặc (5) thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1 (Fig. 30B-D, tương ứng); (6) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (7) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, hoặc (8) thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF (xem các Fig. 31B-31D, tương ứng); hoặc (9) thio kháng xynoCDb79(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, (10) thio kháng xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 hoặc (11) thio kháng xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF (xem các Fig. 32B-32D, tương ứng).

Ig của chuột kháng người được liên hợp PE được sử dụng làm kháng thể phát hiện thứ hai (BD Cat#555787).

Kháng thể kháng CD79b được gắn kết với bề mặt tế bào được phát hiện bằng cách sử dụng Ig của chuột kháng người được liên hợp PE. Các đồ thị của các Fig. 29-32 cho biết rằng gắn kết kháng nguyên là khoảng tương tự với tất cả thể liên hợp dược chất thioMAb được thử nghiệm.

Ví dụ 8: Thử nghiệm đối với việc giảm tăng sinh tế bào In Vitro bởi các thể liên hợp kháng CD79b ThioMab dược chất

Hiệu lực *in vitro* của các thể liên hợp kháng CD79b ThioMAb-dược chất (bao gồm thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MCMMAF, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE và thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1), được xác định bởi thử nghiệm tăng sinh tế bào (Fig. 41A, BJAB-luxiferaza; Fig. 41B, Granta-519; Fig. 41C, WSU-DLCL2). Thử nghiệm CellTiter-Glo® Luminescent Cell Viability là hiện có bán trên thị trường (Promega Corp., Madison, WI), phương pháp thử nghiệm đồng nhất dựa trên sự biểu hiện tái tổ hợp của *Coleoptera* luxiferaza (US 5583024; US 5674713; US 5700670). Thử nghiệm tăng sinh tế bào này xác định số lượng tế bào có thể sống trong môi trường nuôi cấy dựa trên lượng ATP có mặt, chất chỉ thị của tế bào hoạt tính trao đổi chất (Crouch et al., *J. Immunol. Metho.*, 160: 81-88 (1993); US 6602677). Thử nghiệm CellTiter-Glo® được thực hiện trong đĩa 96 giếng, làm cho nó thích hợp để sàng công suất cao tự động (HTS) (Cree et al., *AntiCancer Drugs*, 6:398-404 (1995)). Quy trình thử nghiệm đồng nhất bao gồm bổ sung chất phản ứng đơn (The CellTiter-Glo® Reagent) trực tiếp vào tế bào được nuôi cấy trong môi trường được bổ sung huyết thanh.

Dạng "xác định hỗn hợp bổ sung" đồng nhất dẫn đến làm tan tế bào và sinh ra tỷ lệ tính hiệu huỳnh quang với lượng ATP có mặt. Chất nền, Beetle Luciferin, được carboxyl hoá khử bởi luxiferaza đom đóm tái tổ hợp với sự chuyển hoá concimatant của ATP thành AMP và sinh ra photon. Các tế bào có thể sống được đề cập đến các đơn vị huỳnh quang tương đối (RLU). Các dữ liệu được ghi nhận bởi thiết bị đo độ rọi hoặc thiết bị tạo hình ảnh của máy ảnh CCD. Đầu ra huỳnh quang được thể hiện là RLU, được xác định theo thời gian. %RLU là tỷ lệ phần trăm RLU được làm bình thường hoá được so với đối chứng "không thể liên hợp dược chất". Theo cách khác,

các photon từ huỳnh quang có thể được đếm trong thiết bị đếm nhấp nháy với sự có mặt của chất nhấp nháy. Các đơn vị ánh sáng có thể được thể hiện sau đó như CPS (lượng đếm/giây).

Hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb-dược chất được xác định bởi thử nghiệm tăng sinh tế bào bằng cách dùng quy trình sau, thích hợp từ CellTiter Glo Luminescent Cell Viability Assay, Promega Corp. Technical bulletin TB288; Mendoza et al., *Cancer Res.*, 62: 5485-5488 (2002)):

1. Dịch lỏng gồm 40ml môi trường nuôi cấy tế bào chứa khoảng 3000 BJAB, Granta-519 hoặc WSU-DLCL2 tế bào trong môi trường được đặt vào mỗi giếng trong số 384 giếng, kính có vách theo tấm.

2. TDC (Liên hợp ThioMab Dược chất) (10µl) được bổ sung vào các giếng thử nghiệm gấp bốn lần đến nồng độ cuối cùng là 10000, 3333, 1111, 370, 123, 41, 13,7, 4,6 hoặc 1,5ng/mL, với các giếng đôi chứng "không thể liên hợp dược chất" nhận riêng môi trường nuôi cấy và được ủ trong 3 ngày.

3. Các đĩa này được làm cân bằng đến nhiệt độ trong phòng trong khoảng 30 phút.

4. CellTiter-Glo Reagent (50 µl) được bổ sung vào.

5. Hàm lượng được trộn trong 2 phút trên thiết bị lắc để làm tan tế bào.

6. Ủ đĩa ở nhiệt độ trong phòng trong 10 phút để làm ổn định tín hiệu huỳnh qnang.

7. Huỳnh quang được ghi chép và được báo cáo trong các đồ thị như %RLU (đơn vị huỳnh quang tương đối). Các dữ liệu từ các tế bào được ủ với môi trường không có thể liên hợp dược chất được tạo đồ thị ở 0,51ng/ml.

Môi trường: BJAB, Granta-519 và các tế bào WSU-DLCL2 phát triển trong RPMI1640/10%FBS/2mM glutamin.

Ví dụ 9: Thử nghiệm ức chế sự phát triển khối u in vivo bởi các thể liên hợp kháng CD79b ThioMab dược chất

A. Granta-519 (U lympho tế bào vỏ của người)

Trong nghiên cứu tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu mảnh ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (xem trên đây), thay đổi cấc thể liên

hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb dược chất trong mảnh ghép khác loại Granta-519 (Human Mantle Cell Lymphoma) ở chuột CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất và liều (được dùng ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng) như được thể hiện trong Bảng 11, dưới đây.

Đối chứng Ab là kháng HER2-MC-MMAF hoặc MA79b-MC-MMAF. Đối chứng HC(A118C) thioMAb là thio hu kháng-HER2-HC(A118C)-MMAF thioMAb. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 11 và Fig. 33.

Fig. 33A là các thay đổi đồ thị theo thể tích trung bình trong thời gian ở mảnh ghép khác loại Granta-519 ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C hoặc chuỗi nhẹ V205C kháng-CD79b TDCs, ở các liều như được thể hiện trong Bảng 11. Đặc biệt là, việc dùng thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF và thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF thể hiện sự ức chế sự phát triển khối u khi được so với các đối chứng âm (kháng-hu-HER2-MC-MMAF và thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF. Các đối chứng khác bao gồm MA79b-MC-MMAF.

Hơn nữa, trong nghiên cứu giống nhau, phần trăm thay đổi thể trọng ở 14 ngày đầu tiên được xác định trong mỗi nhóm liều. Các kết quả (Fig. 33B) cho biết việc dùng các thể liên hợp thioMAb dược chất này không dẫn đến giảm đáng kể phần trăm thể trọng hoặc giảm cân nặng trong thời gian này.

Còn hơn nữa, trong Bảng 11, số lượng chuột ngoài tổng số được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được dùng ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không áp dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất với kháng thể)

Bảng 11

Giảm thể tích khối u in vivo,

Dùng liên hợp Thio chMA79b-HC(A118C) hoặc thio chMA79b-LC(V205C) MMAF

các mảnh ghép khác loại Granta-519 ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**
Đối chứng hu-kháng-HER2-MC-MMAF	0/8	0/8	413	6,8	4,0
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	191	6,8	1,85
Đối chứng chMA79b-MC-MMAF	1/8	0/8	100	2,3	3,0
Đối chứng chMA79b-MC-MMAF	8/9	1/9	300	6,8	3,0
Thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	63	2,3	1,9
Thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF	4/9	0/9	190	6,8	1,9
Thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF	0/8	0/8	60	2,3	1,8
Thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF	5/9	4/9	180	6,8	1,8

B. Ghép khác loại BJAB-Luxiferaza (u lympho Burkitt)

Trong nghiên cứu tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (trên đây), thay đổi thể liên hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp dược chất bổ sung được thử nghiệm ở các mảnh ghép khác loại BJAB-luxiferaza (u lympho Burkitt) ở chuột CB17 SCID. Các thể liên hợp dược chất và liều (được dùng ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng) như được thể hiện trong Bảng 12, dưới đây.

Kháng thể đối chứng là huMA79b.v28 (được liên hợp với SMCC-DM1). Đối chứng HC (A118C) thioMAb là kháng thể thio hu-kháng-HER2-HC(A118C) thioMAb (được liên hợp với BMPEO-DM1, MC-MMAF hoặc MCvcPAB-MMAE), thio huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb hoặc thio hu-kháng-CD22(10F4v3)-HC(A118C) thioMAb (được liên hợp MC-MMAF). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 12 và Fig. 34, dưới đây.

Fig. 34A là các thay đổi đồ thị theo thể tích khối u trung bình trong thời gian ở các mảnh ghép khác loại BJAB-luxiferaza ở chuột CB17 SCID được điều trị với các thể liên hợp huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb dược chất như được thể hiện trong Bảng 12. Đặc biệt là, việc dùng liên hợp thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF và thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thioMAb dược chất thể hiện ức chế sự phát triển khối u khi được so với các thể liên hợp kháng thể-dược chất đối chứng âm (thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF và thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE). Các đối chứng khác là thio-huMA79b.v28-HC(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 và thio-hu-kháng-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF.

Hơn nữa, trong nghiên cứu tương tự, phần trăm thay đổi thể trọng ở 7 ngày đầu tiên được xác định ở mỗi nhóm liều. Các kết quả (Fig. 34B) cho biết dùng các thể liên hợp thioMAb dược chất không gây giảm đáng kể phần trăm thể trọng hoặc giảm cân nặng trong thời gian này.

Còn hơn nữa, trong Bảng 12, số lượng chuột ngoài tổng số được thử nghiệm hể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không áp dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất kháng thể)

Bảng 12

Giảm thể tích khối u in vivo,

Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF, và dùng liên hợp DM1

Trong ghép khác loại BJAB-Luxiferaza ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF, MMAE hoặc DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	57	2	1,86
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	58	2	1,9
Thio Đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	46	2	1,55
Đối chứng huMA79b.v28-SMCC-DM1	2/10	3/10	101	2	3,4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	2/10	55	2	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	10/10	57	2	1,95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	10/10	54	2	1,87
Thio đối chứng huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio đối chứng hu-kháng-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	4/10	59	2	1,96

C. WSU-DLCL2 (Ghép các loại u lympho tế bào lớn khuếch tán)

Trong thử nghiệm tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (xem trên đây), thay đổi các thể liên hợp

dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb dược chất ở mảnh ghép khác loại u lympho dạng nang WSU-DLCL2 (u lympho tế bào lớn khuếch tán) ở chuột CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất và liều được thể hiện trong Bảng 13, dưới đây.

Kháng thể đối chứng là huMA79b.v28 (được liên hợp với SMCC-DM1). Đối chứng HC(A118C) thioMAb là kháng thể thio hu-kháng-HER2-HC(A118C) thioMAb (được liên hợp với BMPEO-DM1, MC-MMAF hoặc MCvcPAB-MMAE), thio huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb hoặc thio kháng-CD22 10F4v3-HC(A118C) thioMAb (được liên hợp với MC-MMAF). Các kết ủa được thể hiện trong Bảng 13, dưới đây.

Fig. 35A là các thay đổi đồ thị theo thể tích khối u trung bình trong thời gian ở mảnh ghép khác loại WSU-DLCL2 (U lympho tế bào lớn khuếch tán) ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C kháng CD79b TDC, ở liều như được thể hiện trong Bảng 13. Đặc biệt là, dùng thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF và thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thể hiện sự ức chế phát triển khối u khi được so với các đối chứng âm (thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio-huMA79b.v28-HC(A118C)). Các đối chứng khác bao gồm thio-huMA79b.v28-HC(A118C), huMA79b.v28-SMCC-DM1 và thio hu-kháng-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF.

Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE TDC xuất hiện với hiệu quả nhất của các chất thử nghiệm trong nghiên cứu này.

Hơn nữa, trong thử nghiệm tương tự, phần trăm thay đổi thể trọng ở 7 ngày đầu tiên được xác định trong mỗi nhóm liều. Các kết quả (Fig. 35B) cho biết việc dùng các thể liên hợp thioMAb dược chất này không gây giảm đáng kể phần trăm khối lượng và giảm cân nặng trong thời gian này.

Còn hơn nữa, trong Bảng 13, số lượng chuột ngoài tổng số được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được

giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không áp dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất với kháng thể)

Bảng 13

Giảm thể tích khối u in vivo,

Dùng liên hợp Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF, và DM1

Trong ghép khác loại WSU-DLCL2 ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF, MMAE hoặc DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**
Thio Đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1,86
Thio Đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	115	4	1,9
Thio Đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	92	4	1,55
Đối chứng huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/10	0/10	202	4	3,4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	110	4	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/10	1/10	115	4	1,95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	3/10	108	4	1,87
Thio đối chứng huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA
Thio đối chứng 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	1/10	0/10	118	4	1,96
Thio đối chứng huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	4	NA

D. Ghép khác loại DOHH2 (U lympho dạng nang)

Trong nghiên cứu tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (xem trên đây), thay đổi các thể liên hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb dược chất để giảm thể tích khối u tế bào B ở mô hình ghép khác loại DOHH2 ở chuột CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất và liều (được dùng ở ngày 0 đối với các ADC và đối chứng) được thể hiện trong Bảng 14, dưới đây.

Đối chứng Ab là huMA79b.v28 (được liên hợp với SMCC-DM1). Đối chứng HC(A118C) thioMAb là thio hu-kháng-HER2-HC(A118C) thioMAb (được liên hợp với BMPEO-DM1, MC-MMAF hoặc MCvcPAB-MMAE), thio huMA79b.v28-HC(A118C) thioMab và thio hu-kháng-CD22-HC(A118C) (được liên hợp với MC-MMAF). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 14 và Fig. 36.

Fig. 36A là các thay đổi đồ thị theo thể tích khối u trung bình ở ghép khác loại tế bào DOHH2 ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C TDC, ở các liều như được thể hiện trong Bảng 14. Đặc biệt là, dùng các thể liên hợp thio huMA79b.v28-HC-(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF và thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thioMAb dược chất ở các liều được thể hiện trong Bảng 14 thể hiện ức chế sự phát triển khối u khi được so với các thể liên hợp dược chất đối chứng âm (Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE. Các đối chứng khác bao gồm Thio đối chứng huMA79b.v28-HC(A118C), Thio đối chứng kháng CD22-HC(A118C)-MC-MMAF và Thio đối chứng huMA79b.v28-HC(A118C) và đối chứng huMA79b.v28-SMCC-DM1.

Còn hơn nữa, trong Bảng 14, số lượng chuột ngoài tổng số lượng được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không áp dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất với kháng thể)

Bảng 14

Giảm thể tích khối u in vivo,

Dùng liên hợp Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1, MMAF và MMAE

Trong ghép khác loại DOHH2 ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF hoặc DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/ Ab)**
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1,86
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1,9
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1,55
Control huMA79b.v28-SMCC-DM1	1/8	1/8	202	4	3,4
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/9	1/9	110	4	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	4/9	115	4	1,95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	9/9	108	4	1,87
Thio đối chứng huMA79b.v28-HC(A118C)	1/9	0/9	NA	4	NA
Thio đối chứng kháng CD22-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	118	4	1,96

E. Ghép khác loại BJAB-Luxiferaza (U lympho Burkitt)

Trong nghiên cứu tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3, thay đổi các thể liên hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp dược chất ở ghép khác loại BJAB-luxiferaza (u lympho Burkit) ở chuột CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất

và liều (được dùng ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng) được thể hiện trong Bảng 15, dưới đây.

Kháng thể đối chứng là tá dược (chất đệm đối với riêng ADC). Đối chứng HC (A118C) thioMAb là kháng thể thio hu-kháng-HER2-HC(A118C) thioMAb (được liên hợp với BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE hoặc MC-MMAF), thio huMA79b.v28-HC(A118C) thioMAb hoặc thio kháng CD22 10F4v3-HC(A118C) thioMAb (được liên hợp với MC-MMAF). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 15, dưới đây.

Fig. 37A là các thay đổi theo đồ thị theo thể tích khối u trung bình trong thời gian ở ghép khác loại BJAB-luxiferaza ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C kháng CD79b TDC, ở các liều được thể hiện trong Bảng 15. Đặc biệt là, dùng thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE và thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF thể hiện ức chế sự phát triển khối u khi được so với các đối chứng âm (thio-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF). Các đối chứng khác bao gồm thio huMA79b.v28-HC(A118C) và thio-10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF.

Còn hơn nữa, trong Bảng 15, số lượng chuột ngoài tổng số được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không áp dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất với kháng thể)

Bảng 15

Giảm thể tích khối uIn Vivo,

Dùng liên hợp Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF, và DM1

Trong ghép khác loại BJAB-Luxiferaza ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF, MMAE hoặc DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**
Tá dược đối chứng	0/10	0/10	NA	NA	NA
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	57	2	1,86
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	0/10	23	1	1,55
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	0/10	29	1	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	2/10	0/10	27	1	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/10	0/10	55	2	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	4/10	1/10	27	1	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	3/8	1/8	28	1	1,9
Thio đối chứng huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	1	NA
Thio đối chứng 10F4v3-HC(A118C)-MC-MMAF	0/10	1/10	30	1	1,96

F. Ghép khác loại Granta-519 (U lympho tế bào vỏ của người)

Trong thử nghiệm tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (xem trên đây), thay đổi các thể liên hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb dược chất ở ghép khác loại Granta-519 (U lympho tế bào vỏ ở người) ở chuột CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất và liều (được dùng ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng) được thể hiện trong Bảng 16, dưới đây.

Đối chứng HC(A118C) thioMAb là thio hu-kháng-HER2-HC(A118C) thioMAb (được liên hợp với BMPEO-DM1 hoặc MC-MMAF). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 16 và Fig. 38.

Fig. 38A là các thay đổi đồ thị theo thể tích trung bình của khối u trong thời gian ở ghép khác loại Granta 519 ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C kháng CD79b TDCs, ở các liều như được thể hiện trong Bảng 16. Đặc biệt là, dùng các thể liên hợp thio huMA79b.v28-HC-(A118C)-BMPEO-DM1 và thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF thioMAb dược chất ở các liều được thể hiện trong Bảng 16 thể hiện ức chế sự phát triển khối u khi được so với các thể liên hợp đối chứng dược chất.

Hơn nữa, trong nghiên cứu tương tự, phần trăm thay đổi thể trọng ở 14 ngày đầu tiên được dùng trong mỗi nhóm liều. Các kết quả (Fig. 38B) cho biết việc dùng các thể liên hợp thioMAb dược chất không dẫn đến giảm phần trăm thay đổi thể trọng hoặc gây giảm cân nặng trong thời gian này.

Trong Bảng 16, số lượng chuột ngoài tổng số lượng được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu. (DAR = Tỷ lệ dược chất với sáng chế)

Bảng 16

Giảm thể tích khối in vivo,

Dùng liên hợp Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1 và MMAF

Trong ghép khác loại Granta-519 ở chuột CB17 SCID

Kháng thể	**PR**	**CR**	**Liều MMAF hoặc DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	342	12	1,86
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/8	0/8	346	12	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/6	0/6	55	2	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/8	0/8	110	4	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/8	4/8	219	8	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	5/8	329	12	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	1/8	1/8	57	2	1,95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	2/8	1/8	115	4	1,95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	6/8	2/8	229	8	1,95
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	4/8	4/8	344	12	1,95

G. Ghép khác loại WSU-DLCL2 (U lympho tế bào lớn khuếch tán)

Trong nghiên cứu tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (xem trên), thay đổi các thể liên hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb dược chất ở ghép khác loại WSU-DLCL2 (U lympho tế bào lớn khuếch tán) ở chuột CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất và liều (được dùng ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng) được thể hiện trong Bảng 17, dưới đây.

Kháng thể đối chứng là tá dược (chất đệm riêng (đối với ADC)). Đối chứng thio Mabs là kháng thể thio hu-kháng-HER2-HC(A118C) thioMAbs (được liên hợp với BMPEO-DM1, MCvcPAB-MMAE hoặc MC-MMAF). Các kết quả được thể hiện trong Bảng 17 và Fig. 39.

Fig. 39 là các thay đổi đồ thị theo thể tích khối u trung bình trong thời gian ở ghép khác loại WSU-DLCL2 ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C

kháng CD79b TDC, ở liều như được thể hiện trong Bảng 17. Đặc biệt là, dùng thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF và thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (ở liều Ab là 0,5, 1,0mg/kg, 2,0mg/kg và 4,0mg/kg) thể hiện ức chế sự phát triển khối u khi được so với các đối chứng âm (thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF và A-tá dược).

Còn hơn nữa, trong Bảng 17, số lượng chuột ngoài tổng số được thử naghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không áp dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất với kháng thể)

Bảng 17

Giảm thể tích khối u in vivo,

Dùng liên hợp Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) MMAE, MMAF, và DM1

Trong ghép khác loại WSU-DLCL2 ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF, MMAE hoặc DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**
Tá dược đối chứng	0/9	0/9	NA	NA	NA
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	114	4	1,86
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	92	4	1,55
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	115	4	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	5/9	2/9	112	4	1,9

Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	4/9	0/9	110	4	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	0/9	14	0,5	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	27	1,0	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	1/9	55	2,0	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	7/9	110	4,0	1,9

H. Ghép khác loại Granta-519 (U lympho tế bào vỏ của người)

Trong nghiên cứu tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (xem trên), thay đổi các thể liên hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb dược chất ở ghép khác loại Granta-519 (U lympho tế bào vỏ ở người) ở chuột CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất và liều (được dùng ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng) được thể hiện trong Bảng 18, dưới đây.

Đối chứng thio MAbs là kháng thể thio hu-kháng-HER2-HC(A118C) (được liên hợp với BMPEO-DM1) và thio hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thioMAb. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 18, dưới đây.

Fig. 40A là các thay đổi đồ thị theo thể tích khối u trung bình trong thời gian ở ghép khác loại Granta-519 ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C kháng CD79b TDC, ở các liều như được thể hiện trong Bảng 18. Đặc biệt là, dùng thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 và thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE (ở liều Ab là 1,0mg/kg, 2,0mg/kg và 4,0mg/kg) thể hiện ức chế sự phát triển khối u khi được so với các đối chứng âm (thio-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1 và thio-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE.

Còn hơn nữa, trong Bảng 18, số lượng chuột ngoài tổng số được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR =

Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không ứng dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất với kháng thể)

Bảng 18

Giảm thể tích khối u in vivo,

Dùng liên hợp Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1 và MMAE

Trong ghép khác loại Granta-519 ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF, MMAE hoặc DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	114	4	1,86
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/10	1/10	92	4	1,55
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/10	0/10	110	4	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	1/10	13	0,5	1,87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/10	0/10	27	1,0	1,87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/10	7/10	54	2,0	1,87
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/10	10/10	108	4,0	1,87

I. Ghép khác loại BJAB-xynoCD79b

Trong nghiên cứu tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (xem trên), thay đổi các thể liên hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb dược chất ở tế bào BJAB (u lympho Burkitt) biểu hiện ghép khác loại ở xynoCD79b (BJAB-xynoCD79b)

ở CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất và liều (được dùng ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng) được thể hiện trong Bảng 18, dưới đây.

Đối chứng Ab là tá dược (riêng chất đệm). Đối chứng thio MAbs là kháng thể thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF và thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE thioMAb. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 19 và Fig. 50.

Fig. 50 là ức chế theo đồ thị sự phát triển khối u trong thời gian ở ghép khác loại BJAB-xynoCD79b ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C kháng CD79b TDC, ở các liều được thể hiện trong Bảng 19. Đặc biệt là, dùng thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE và thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF cũng như thio-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE và thio-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF thể hiện ức chế sự phát triển khối u khi được so với các đối chứng âm (thio-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE và thio-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF và A-tá dược).

Còn hơn nữa, trong Bảng 19, số lượng chuột ngoài tổng số được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không áp dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất với kháng thể)

Bảng 19

Giảm thể tích khối u in vivo,

Dùng liên hợp Thio anti-xyno CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1, MMAF hoặc MMAE hoặc Thio HuMA79b.v28 DM1, MMAF hoặc MMAE

Trong ghép khác loại BJAB-xynoCD79b ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF, MMAE hoặc**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**

			DM1 (µg/m²)		
Tá dược đối chứng	0/9	0/9	NA	NA	NA
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/9	0/9	57	2	1,86
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	0/9	0/9	23	1	1,55
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	0/9	29	1	1,9
Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/8	1/8	53	2	1,8
Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	1/9	2/9	27	1	1,86
Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF	0/9	1/9	28	1	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	3/9	0/9	55	2	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE	2/9	2/9	27	1	1,9
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF	7/9	1/9	28	1	1,9

J. Ghép khác loại BJAB-xynoCD79b

Trong nghiên cứu tương tự, bằng cách sử dụng quy trình nghiên cứu ghép khác loại tương tự như được mô tả trong Ví dụ 3 (xem trên), thay đổi các thể liên hợp dược chất và liều được dùng, hiệu quả của các thể liên hợp thioMAb dược chất ở tế bào BJAB (u lympho Burkitt) biểu hiện ghép khác loại ở xynoCD79b (BJAB-xynoCD79b) ở chuột CB17 SCID được nghiên cứu. Các thể liên hợp dược chất và liều (được dùng ở ngày 0 đối với tất cả ADC và đối chứng) được thể hiện trong Bảng 19, dưới đây.

Đối chứng thio MAbs là kháng thể thio-hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, thio-huMA79b.v28-HC(A118C), và thio-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) thioMAbs. Các kết quả được thể hiện trong Bảng 20 và Fig. 51.

Fig. 51 là ức chế theo đồ thị sự phát triển khối u trong thời gian ở ghép khác loại BJAB-xynoCD79b ở chuột CB17 SCID được điều trị với chuỗi nặng A118C kháng CD79b TDC, ở các liều như được thể hiện trong Bảng 20. Đặc biệt là, dùng thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1 cũng như thio-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 thể hiện ức chế sự phát triển khối u khi được so với các đối chứng âm (thio-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1. Các đối chứng khác bao gồm thio-hu-MA79b.v28-HC(A118C) và thio-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C).

Các kết quả được thể hiện trong Bảng 20, dưới đây. Trong Bảng 20, số lượng chuột ngoài tổng số được thử nghiệm thể hiện PR = Thoái biến một phần (khi thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến dưới 50% thể tích khối u được xác định ở ngày 0) hoặc CR = Thoái biến hoàn toàn (trong đó thể tích khối u ở thời gian bất kỳ sau khi dùng được giảm đến 0 mm^3) được nêu và NA = không áp dụng. (DAR = Tỷ lệ dược chất với kháng thể)

Bảng 20

Giảm thể tích khối u in vivo,

Dùng liên hợp Thio anti-xyno CD79b(ch10D10)-HC(A118C) DM1 hoặc Thio HuMA79b.v28-HC(A118C) DM1

Trong ghép khác loại BJAB-xynoCD79b ở chuột CB17 SCID

Kháng thể được dùng	**PR**	**CR**	**Liều MMAF, MMAE hoặc DM1 ($\mu g/m^2$)**	**Liều Ab (mg/kg)**	**DAR (Dược chất/Ab)**
Thio đối chứng hu-kháng-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	57	2	1,86
Thio đối chứng huMA79b.v28-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio đối chứng anti-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)	0/10	0/10	NA	2	NA
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	1/10	0/10	27	1	1,85
Thio huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	2/10	55	2	1,85
Thio kháng xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	0/10	27	1	1,8
Thio kháng xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1	0/10	1/10	53	2	1,8

Sự mô tả trên đây được xem là đủ đối với chuyên gia trong lĩnh vực này để thực hiện sáng chế. Sáng chế không bị giới hạn đến phạm vi bởi cấu trúc được lưu giữ, do phương án nhằm mục đích minh hoạ một số khía cạnh theo sáng chế và cấu trúc bất kỳ mà tương đương về mặt chức năng trong phạm vi sáng chế. Việc lưu giữ nguyên liệu ở đây không tạo nên sự thừa nhận rằng sự mô tả ở đây là không thích hợp với khả năng thực hiện khía cạnh bất kỳ theo sáng chế, bao gồm phương thức tốt nhất của nó, cũng

không được cho là giới hạn phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ với sự minh hoạ cụ thể mà nó thể hiện. Thực vậy, các cải biến khác nhau theo sáng chế ngoài các cải biến được thể hiện và được mô tả ở đây sẽ trở nên rõ ràng đối với chuyên gia trong lĩnh vực này dựa trên sự mô tả trên đây và nằm trong phạm vi của các điểm yêu cầu bảo hộ kèm theo.

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người chứa:

(a-1) vùng biến đổi của chuỗi nặng chứa các trình tự HVR1-HC, HVR2-HC, và HVR3-HC nêu trong SEQ ID NO: 221-223 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ chứa các trình tự HVR1-LC, HVR2-LC, và HVR3-LC nêu trong SEQ ID NO: 213-215, mà liên kết với cùng epitop với kháng thể đơn dòng chứa các vùng biến đổi SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 14; hoặc

(a-2) vùng biến đổi của chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 227 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 226; hoặc

(a-3) polypeptit chuỗi nặng nêu trong SEQ ID NO: 310 và polypeptit chuỗi nhẹ nêu trong SEQ ID NO: 309; hoặc

(a-4) vùng biến đổi của chuỗi nặng có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 227 và vùng biến đổi của chuỗi nhẹ có trình tự axit amin tương đồng ít nhất 90% với trình tự axit amin SEQ ID NO: 226, trong đó kháng thể này được được làm thích hợp với người và ái lực của kháng thể này ở dạng hóa trị hai của nó với CD79b người gần như bằng hoặc lớn hơn ít nhất 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 lần so với ái lực của kháng thể chuột hoặc kháng thể khảm chứa trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 14 ở dạng hóa trị hai của nó, trong đó ái lực liên kết được biểu thị bằng trị số Kd, và trong đó ái lực liên kết được đo bằng Biacore hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ.

2. Kháng thể kháng CD79b được làm thích hợp với người chứa HVR-L1, HVR-L2, HVR-L3, HVR-H1, HVR-H2, và HVR-H3:

trong đó HVR-L1 chứa biến thể HVR-L1 trong đó vị trí A9 trong trình tự A1-A15 được biến đổi thành S, trong đó A1-A15 là KASQSVDYDGDSFLN;

trong đó HVR-H3 chứa biến thể HVR-H3 trong đó vị trí F6 trong trình tự F1-F10 được biến đổi thành I, vị trí F7 được biến đổi thành R, và vị trí F8 được biến đổi thành L, trong đó F1-F10 là TRRVPVYFDY;

và trong đó ba trong số bốn trình tự HVR-L2, HVR-L3, HVH-H1 và HVH-H2 được chọn từ nhóm gồm:

(i) HVR-L2 chứa trình tự B1-B7, trong đó B1-B7 là AASNLES;

(ii) HVR-L3 chứa trình tự C1-C9, trong đó C1-C9 là QQSNEDPLT;

(iii) HVR-H1 chứa trình tự D1-D10, trong đó D1-D10 là GYTFSSYWIE; và

(iv) HVR-H2 chứa trình tự E1-E18, trong đó E1-E18 là

GEILPGGGDTNYNEIFKG;

trong đó ái lực của kháng thể này ở dạng hóa trị hai của nó với CD79b người là gần như bằng hoặc hoặc lớn hơn ít nhất 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9 hoặc 10 lần so với ái lực của kháng thể chuột hoặc kháng thể khảm chứa các trình tự vùng biến đổi của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng SEQ ID NO: 10 và SEQ ID NO: 14 ở dạng hóa trị hai của nó, trong đó ái lực liên kết được biểu thị bằng trị số Kd, và trong đó ái lực liên kết được đo bằng Biacore hoặc thử nghiệm miễn dịch phóng xạ.

3. Kháng thể được làm thích hợp với người theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này liên kết với cùng epitop với kháng thể đơn dòng chứa các vùng biến đổi SEQ ID NO:10 và SEQ ID NO:14.

4. Kháng thể được làm thích hợp với người theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó kháng thể này liên kết với epitop trong vùng CD79b từ axit amin 29-39 của SEQ ID NO: 2 hoặc axit amin 1-11 của SEQ ID NO: 16.

5. Kháng thể được làm thích hợp với người theo điểm 1, trong đó kháng thể này là (i) kháng thể đơn dòng; hoặc (ii) mảnh kháng thể được chọn từ mảnh Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, hoặc $(Fab')_2$, tùy ý là kháng thể hóa trị một hoặc hóa trị hai, tùy ý chứa vùng Fab đơn được liên kết với vùng Fc.

6. Kháng thể được làm thích hợp với người theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trình tự này chứa trình tự khung liên ứng với phân nhóm I của chuỗi nhẹ kapa người và/hoặc trình tự khung liên ứng với phân nhóm III của chuỗi nặng người.

7. Kháng thể được làm thích hợp với người theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, trong đó trình tự này chứa:

(i) trình tự khung liên ứng với phân nhóm I của chuỗi nhẹ kapa người có sự thay thế ở vị trí 4 và/hoặc vị trí 47, tùy ý là M4L và/hoặc L47F; và/hoặc

(ii) trình tự khung liên ứng với phân nhóm III của chuỗi nặng người có sự thay thế ở vị trí 48, 67, 69, 71, 73, và/hoặc 78, tùy ý là V48I, F67A, I69F, R71A, N73T, và/hoặc L78A.

8. Quy trình sản xuất kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm nêu trên, bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ trong điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể này và thu hồi kháng thể này từ giống nuôi cấy tế bào.

9. Thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể theo bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 được gắn kết cộng hóa trị với:

(i) tác nhân độc tế bào, túy ý là tác nhân hóa trị liệu, gốc thuốc, chất kháng sinh, chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ, hoặc enzym phân cắt liên kết giữa các nucleotit;

(ii) nhãn bắt giữ, tùy ý là nhãn bắt giữ biotin;

(iii) nhãn phát hiện, tùy ý là nhãn phát hiện bằng thuốc nhuộm huỳnh quang như loại fluorescein, loại rhodamin, dansyl, Lissamine, xyanin, phycoerythrin, đỏ Texas, hoặc các chất tương tự của chúng, hoặc nhãn phát hiện bằng nuclit phóng xạ được chọn từ ^{3}H, ^{11}C, ^{14}C, ^{18}F, ^{32}P, ^{35}S, ^{64}Cu, ^{68}Ga, ^{86}Y, ^{99}Tc, ^{111}In, ^{123}I, ^{124}I, ^{125}I, ^{131}I, ^{133}Xe, ^{177}Lu, ^{211}At, và ^{213}Bi; trong đó kháng thể này tùy ý được gắn kết với nhãn phát hiện bằng phối tử tạo chelat, tùy ý là DOTA, DOTP, DOTMA, DTPA, hoặc TETA.

10. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 9, trong đó thể liên hợp miễn dịch này có công thức:

$Ab-(L-D)_p$,

trong đó:

(a) Ab là kháng thể theo điểm bết kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7;

(b) L là cầu liên kết; và

(c) D là gốc thuốc,

trong đó tùy ý, L là 6-maleimidocaproyl (MC), maleimidopropanoyl (MP), valin-citrullin (val-cit), alanin-phenylalanin (ala-phe), p-aminobenzyloxycarbonyl (PAB), N-sucxinimidyl 4-(2-pyridylthio) pentanoat (SPP), N-sucxinimidyl 4-(N-

maleimidometyl) xyclohexan-1 carboxylat (SMCC), hoặc N-Sucxinimidyl (4-iodo-axetyl) aminobenzoat (SIAB); và/hoặc D là auristatin hoặc dolastatin.

11. Thể liên hợp miễn dịch theo điểm 9, trong đó thể liên hợp miễn dịch này chứa gốc thuốc auristatin hoặc maytansinoid (D), trong đó kháng thể được gắn kết bằng gốc liên kết (L) với D; thể liên hợp miễn dịch này có công thức I:

$$Ab\text{-}(L\text{-}D)_p \qquad I$$

trong đó p là 1 đến 8; trong đó tùy ý

(i) L có công thức:

$$—A_a—W_w—Y_y—$$

trong đó:

A là đơn vị Stretcher;

a là 0 hoặc 1;

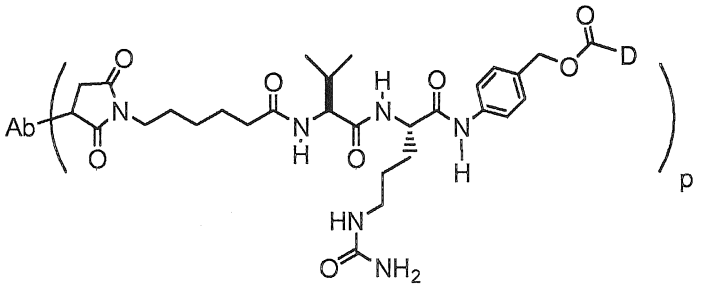
mỗi W độc lập là đơn vị axit amin;

w là số nguyên nằm trong khoảng từ 0 đến 12;

Y là đơn vị Spacer được gắn kết cộng hóa trị với gốc thuốc; và

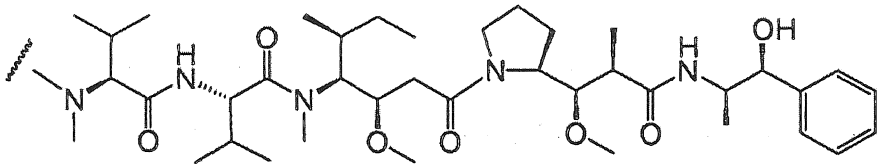
y là 0, 1, hoặc 2;

(ii) thể liên hợp miễn dịch có công thức:



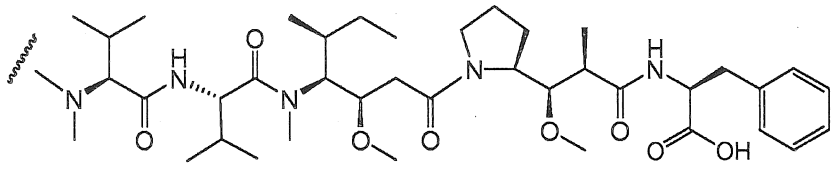
(iii) L là SMCC, SPP, hoặc SPDB;

(iv) D là MMAE, có công thức:



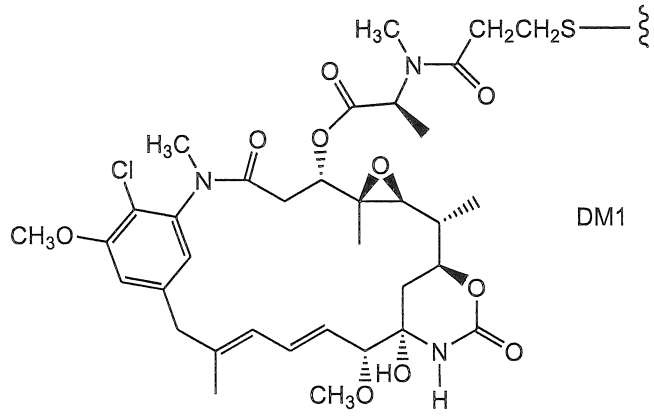
trong đó đường lượn sóng chỉ vị trí gắn kết với cầu liên kết L;

(v) D là MMAF, có công thức:

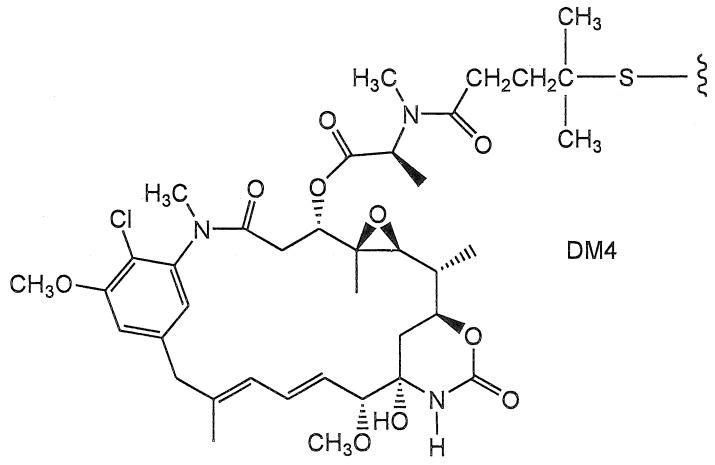


trong đó đường lượn sóng chỉ vị trí gắn kết với cầu liên kết L;

(vi) D là DM1 hoặc DM4, có công thức:



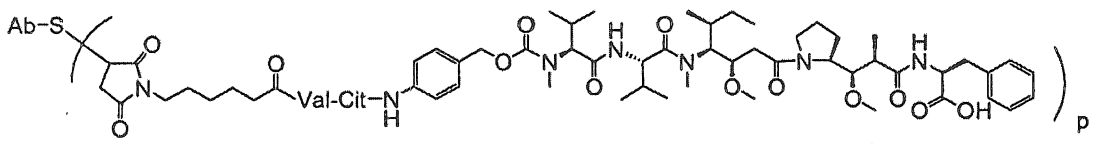
DM1



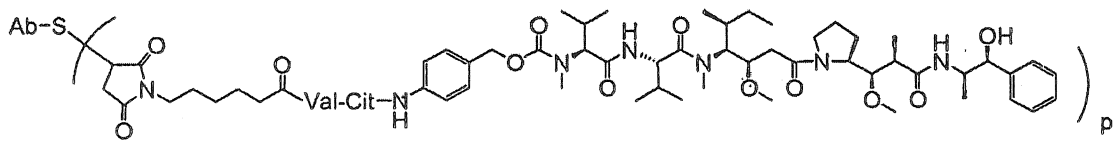
DM4

trong đó đường lượn sóng chỉ vị trí gắn kết với cầu liên kết L;

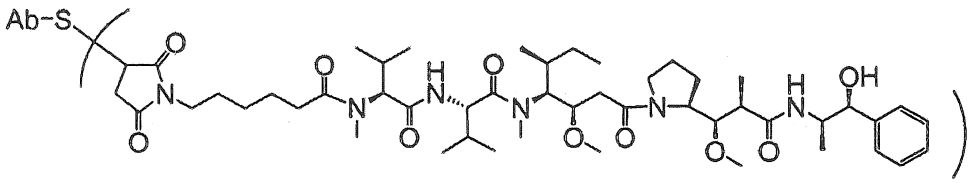
(vii) hợp chất liên hợp miễn dịch được chọn từ các công thức:



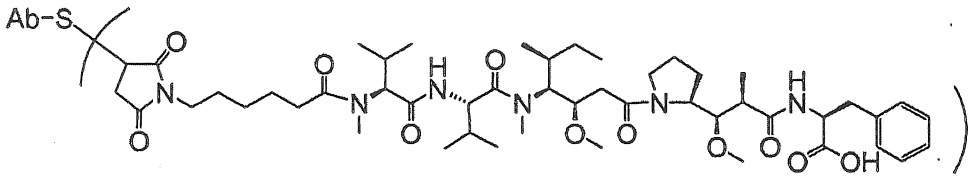
Ab-MC-vc-PAB-MMAF



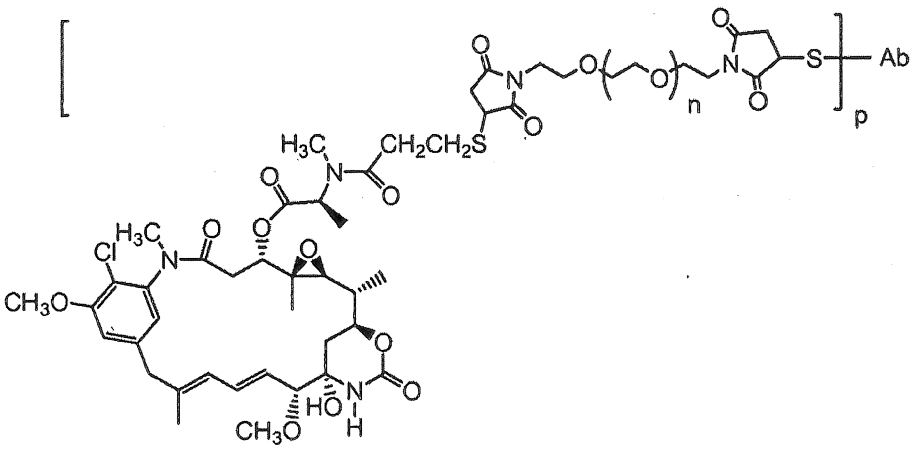
Ab-MC-vc-PAB-MMAE



Ab-MC-MMAE



Ab-MC-MMAF



Ab-BMPEO-DM1

trong đó Val là valin và Cit là citrullin; và/hoặc

(viii) L là MC-val-cit-PAB hoặc MC.

12. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, hoặc thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, và chất mang dược dụng, tùy ý kết hợp với tác nhân độc tế bào.

13. Phương pháp xác định sự có mặt của protein CD79b trong mẫu nghi là chứa protein này, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu tiếp xúc với kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, và xác định liên kết của kháng thể này hoặc thể liên hợp

miễn dịch này với protein CD79b trong mẫu, trong đó liên kết của kháng thể hoặc thể liên hợp miễn dịch với protein đã nêu chỉ thị sự có mặt của protein này trong mẫu; trong đó mẫu tùy ý từ bệnh nhân nghi là mắc rối loạn tăng sinh tế bào B, tùy ý là u lympho, u lympho không-Hodgkin (NHL), NHL xâm lấn, NHL xâm lấn tái phát, NHL không đau tái phát, NHL dai dẳng, NHL không đau dai dẳng, bệnh bạch cầu lympho bào mạn tính (CLL), u lympho với lympho bào nhỏ, bệnh bạch cầu, bệnh bạch cầu tế bào tóc (HCL), bệnh bạch cầu lympho bào cấp (ALL), và u lympho tế bào vỏ.

14. Phương pháp in vitro ức chế sự sinh trưởng của tế bào biểu hiện CD79b, phương pháp này bao gồm bước cho tế bào tiếp xúc với kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11, trong đó tế bào này túy ý là tế bào B và/hoặc tế bào khối u.

15. Phương pháp phát hiện sự có mặt của CD79b trong mẫu sinh học, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học này tiếp xúc với kháng thể kháng CD79b theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 hoặc thể liên hợp miễn dịch theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 9 đến 11 trong điều kiện cho phép kháng thể kháng CD79b hoặc thể liên hợp miễn dịch liên kết với CD79b, và phát hiện xem phức có được tạo ra giữa kháng thể kháng CD79b hoặc thể liên hợp miễn dịch và CD79b hay không.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Genentech, Inc.

<120> KHÁNG THỂ KHÁNG CD79B, QUY TRÌNH SẢN XUẤT CHÚNG, THỂ LIÊN HỢP MIỄN DỊCH VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA CHÚNG

<130> RTX/FP6780514

<140> Không biết, được nộp cùng

<141> 2008-07-15

<150> 08781859.7
<151> 2008-07-15

<150> PCT/US2008/070088
<151> 2008-07-15

<150> US 60/950,052
<151> 2007-07-16

<150> US 61/025,137
<151> 2008-01-31

<150> US 61/032,790
<151> 2008-02-29

<150> US 61/054,709
<151> 2008-05-20

<160> 310

<210> 1
<211> 1270
<212> ADN
<213> Người hiện đại

<400> 1
caggggacag gctgcagccg gtgcagttac acgttttcct ccaaggagcc 50

tcggacgttg tcacgggttt ggggtcgggg acagagcagt gaccatggcc 100

aggctggcgt tgtctcctgt gcccagccac tggatggtgg cgttgctgct 150

gctgctctca gctgagccag taccagcagc cagatcggag gaccggtacc 200

ggaatcccaa aggtagtgct tgttcgcgga tctggcagag cccacgtttc 250

atagccagga aacggggctt cacggtgaaa atgcactgct acatgaacag 300

cgcctccggc aatgtgagct ggctctggaa gcaggagatg gacgagaatc 350

cccagcagct gaagctggaa aagggccgca tggaagagtc ccagaacgaa 400

tctctcgcca ccctcaccat ccaaggcatc cggtttgagg acaatggcat 450

ctacttctgt cagcagaagt gcaacaacac ctcggaggtc taccagggct 500

gcggcacaga gctgcgagtc atgggattca gcaccttggc acagctgaag 550

cagaggaaca cgctgaagga tggtatcatc atgatccaga cgctgctgat 600

catcctcttc atcatcgtgc ctatcttcct gctgctggac aaggatgaca 650

gcaaggctgg catggaggaa gatcacacct acgagggcct ggacattgac 700

cagacagcca cctatgagga catagtgacg ctgcggacag gggaagtgaa 750

gtggtctgta ggtgagcacc caggccagga gtgagagcca ggtcgcccca 800

tgacctgggt gcaggctccc tggcctcagt gactgcttcg gagctgcctg 850

gctcatggcc caaccccttt cctggacccc ccagctggcc tctgaagctg 900

gcccaccaga gctgccattt gtctccagcc cctggtcccc agctcttgcc 950

aaagggcctg gagtagaagg acaacagggc agcaacttgg agggagttct 1000

ctggggatgg acgggaccca gccttctggg ggtgctatga ggtgatccgt 1050

ccccacacat gggatggggg aggcagagac tggtccagag cccgcaaatg 1100

gactcggagc cgagggcctc ccagcagagc ttgggaaggg ccatggaccc 1150

aactgggccc cagaagagcc acaggaacat cattcctctc ccgcaaccac 1200

tcccacccca gggaggccct ggcctccagt gccttccccc gtggaataaa 1250

cggtgtgtcc tgagaaacca 1270

<210> 2
<211> 229
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 2

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

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala Arg
20 25 30

Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser Arg
35 40 45

Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe Thr
50 55 60

Val Lys Met His Cys Tyr Met Asn Ser Ala Ser Gly Asn Val Ser
65 70 75

Trp Leu Trp Lys Gln Glu Met Asp Glu Asn Pro Gln Gln Leu Lys
80 85 90

Leu Glu Lys Gly Arg Met Glu Glu Ser Gln Asn Glu Ser Leu Ala
95 100 105

Thr Leu Thr Ile Gln Gly Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly Ile Tyr
110 115 120

Phe Cys Gln Gln Lys Cys Asn Asn Thr Ser Glu Val Tyr Gln Gly
125 130 135

Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu Ala Gln
140 145 150

Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met Ile Gln
155 160 165

Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu
170 175 180

Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr
185 190 195

Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile
200 205 210

Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His
215 220 225

Pro Gly Gln Glu

<210> 3
<211> 929
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể khảm (chMA79b)

<400> 3
cactcccagc tccaactgca cctcggttct atcgattgaa ttccaccatg 50

ggatggtcat gtatcatcct ttttctagta gcaactgcaa ctggagtaca 100

ttcagatatc gtgctgaccc aatctccagc ttctttggct gtgtctctgg 150

ggcagagggc caccatctcc tgcaaggcca gccaaagtgt tgattatgat 200

ggtgatagtt ttttgaactg gtaccaacag aaaccaggac agccacccaa 250

actcttcatc tatgctgcat ccaatctaga atctgggatc ccagccaggt 300

ttagtggcag tgggtctggg acagacttca ccctcaacat ccatcctgtg 350

gaggaggagg atgctgcaac ctattactgt cagcaaagta atgaggatcc 400

gctcacgttc ggggcaggca ccgagctgga actcaaacgg accgtggctg 450

caccatctgt cttcatcttc ccgccatctg atgagcagtt gaaatctgga 500

actgcctctg ttgtgtgcct gctgaataac ttctatccca gagaggccaa 550

agtacagtgg aaggtggata acgccctcca atcgggtaac tcccaggaga 600

gtgtcacaga gcaggacagc aaggacagca cctacagcct cagcagcacc 650

ctgacgctga gcaaagcaga ctacgagaaa cacaaagtct acgcctgcga 700

agtcacccat cagggcctga gctcgcccgt cacaaagagc ttcaacaggg 750

gagagtgtta agcttggccg ccatggccca acttgtttat tgcagcttat 800

aatggttaca aataaagcaa tagcatcaca aatttcacaa ataaagcatt 850

tttttcactg cattctagtt gtggtttgtc caaactcatc aatgtatctt 900

atcatgtctg gatcgggaat taattcggc 929

<210> 4
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của kháng thể khảm (chMA79b)

<400> 4

Asp	Ile	Val	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ala	Ser	Leu	Ala	Val	Ser	Leu	
1				5				10						15	
Gly	Gln	Arg	Ala	Thr	Ile	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gln	Ser	Val	Asp	
				20				25						30	
Tyr	Asp	Gly	Asp	Ser	Phe	Leu	Asn	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	
				35				40						45	
Gln	Pro	Pro	Lys	Leu	Phe	Ile	Tyr	Ala	Ala	Ser	Asn	Leu	Glu	Ser	
				50				55						60	
Gly	Ile	Pro	Ala	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	
				65				70						75	
Thr	Leu	Asn	Ile	His	Pro	Val	Glu	Glu	Glu	Asp	Ala	Ala	Thr	Tyr	
				80				85						90	
Tyr	Cys	Gln	Gln	Ser	Asn	Glu	Asp	Pro	Leu	Thr	Phe	Gly	Ala	Gly	
				95				100						105	
Thr	Glu	Leu	Glu	Leu	Lys	Arg	Thr	Val	Ala	Ala	Pro	Ser	Val	Phe	
				110				115						120	
Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser	Gly	Thr	Ala	Ser	
				125				130						135	
Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu	Ala	Lys	Val	
				140				145						150	
Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser	Gln	Glu	
				155				160						165	
Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu	Ser	
				170				175						180	
Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val	
				185				190						195	
Tyr	Ala	Cys	Glu	Val	Thr	His	Gln	Gly	Leu	Ser	Ser	Pro	Val	Thr	
				200				205						210	
Lys	Ser	Phe	Asn	Arg	Gly	Glu	Cys								
				215											

<210> 5
<211> 1469
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của kháng thể khảm (chMA79b)

<400> 5

tcggttctat cgattgaatt ccaccatggg atggtcatgt atcatccttt 50

ttctagtagc aactgcaact ggagtacatt cagaagttca gctgcagcag 100

tctggggctg aactgatgaa gcctggggcc tcagtgaaga tatcctgcaa 150

ggctactggc tacacattca gtagttactg gatagagtgg gtaaagcaga 200

ggcctggaca tggccttgag tggattggag agattttacc tggaggtggt 250

gatactaact acaatgagat tttcaagggc aaggccacat tcactgcaga 300

tacatcctcc aacacagcct acatgcaact cagcagcctg acatctgagg 350

actctgccgt ctattactgt acaagacgag taccggttta ctttgactac 400

tggggccaag gaacctcagt caccgtctcc tcagcctcca ccaagggccc 450

atcggtcttc cccctggcac cctcctccaa gagcacctct gggggcacag 500

cggccctggg ctgcctggtc aaggactact tccccgaacc ggtgacggtg 550

tcgtggaact caggcgccct gaccagcggc gtgcacacct tcccggctgt 600

cctacagtcc tcaggactct actccctcag cagcgtggtg actgtgccct 650

ctagcagctt gggcacccag acctacatct gcaacgtgaa tcacaagccc 700

agcaacacca aggtggacaa gaaagttgag cccaaatctt gtgacaaaac 750

tcacacatgc ccaccgtgcc cagcacctga actcctgggg ggaccgtcag 800

tcttcctctt ccccccaaaa cccaaggaca ccctcatgat ctcccggacc 850

cctgaggtca catgcgtggt ggtggacgtg agccacgaag accctgaggt 900

caagttcaac tggtacgtgg acggcgtgga ggtgcataat gccaagacaa 950

agccgcggga ggagcagtac aacagcacgt accgtgtggt cagcgtcctc 1000

accgtcctgc accaggactg gctgaatggc aaggagtaca agtgcaaggt 1050

ctccaacaaa gccctcccag cccccatcga gaaaaccatc tccaaagcca 1100

aagggcagcc ccgagaacca caggtgtaca ccctgccccc atcccgggaa 1150

gagatgacca agaaccaggt cagcctgacc tgcctggtca aaggcttcta 1200

tcccagcgac atcgccgtgg agtgggagag caatgggcag ccggagaaca 1250

actacaagac cacgcctccc gtgctggact ccgacggctc cttcttcctc 1300

tacagcaagc tcaccgtgga caagagcagg tggcagcagg ggaacgtctt 1350

ctcatgctcc gtgatgcatg aggctctgca caaccactac acgcagaaga 1400

gcctctccct gtctccgggt aaatgagtgc gacggcccta gagtcgacct 1450

gcagaagctt ggccgccat 1469

<210> 6
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của kháng thể khảm (chMA79b)

<400> 6

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
            50                  55                  60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser
            65                  70                  75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
            80                  85                  90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
            95                  100                 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
            110                 115                 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
            125                 130                 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
            140                 145                 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
            155                 160                 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
            170                 175                 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
            185                 190                 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
            200                 205                 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
            215                 220                 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
            230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
            245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
            290                 295                 300
```

```
Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                305                 310                 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                320                 325                 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                335                 340                 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                350                 355                 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                365                 370                 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                380                 385                 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                395                 400                 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                410                 415                 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                425                 430                 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                440                 445
```

<210> 7
<211> 231
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 7

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

Ala Leu Leu Leu Leu Leu Ser Ala Ala Glu Pro Val Pro Ala Ala
                20                  25                  30

Lys Ser Glu Asp Leu Tyr Pro Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys Ser
                35                  40                  45

Arg Ile Trp Gln Ser Pro Arg Phe Ile Ala Arg Lys Arg Gly Phe
                50                  55                  60

Thr Val Lys Met His Cys Tyr Val Thr Asn Ser Thr Phe Ser Ile
                65                  70                  75

Val Ser Trp Leu Arg Lys Arg Glu Thr Asp Lys Glu Pro Gln Gln
                80                  85                  90

Val Asn Leu Glu Gln Gly His Met His Gln Thr Gln Asn Ser Ser
                95                  100                 105

Val Thr Thr Leu Ile Ile Gln Asp Ile Arg Phe Glu Asp Asn Gly
                110                 115                 120

Ile Tyr Phe Cys Gln Gln Glu Cys Ser Lys Thr Ser Glu Val Tyr
                125                 130                 135
```

```
Arg Gly Cys Gly Thr Glu Leu Arg Val Met Gly Phe Ser Thr Leu
                140                 145                 150

Ala Gln Leu Lys Gln Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Met
                155                 160                 165

Ile Gln Thr Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe
                170                 175                 180

Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Ala Asp
                185                 190                 195

His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu
                200                 205                 210

Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly
                215                 220                 225

Glu His Pro Gly Gln Glu
                230
```

<210> 8
<211> 228
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 8

```
 Met Ala Thr Leu Val Leu Ser Ser Met Pro Cys His Trp Leu Leu
   1               5                  10                  15

 Phe Leu Leu Leu Leu Phe Ser Gly Glu Pro Val Pro Ala Met Thr
                20                  25                  30

 Ser Ser Asp Leu Pro Leu Asn Phe Gln Gly Ser Pro Cys Ser Gln
                35                  40                  45

 Ile Trp Gln His Pro Arg Phe Ala Ala Lys Lys Arg Ser Ser Met
                50                  55                  60

 Val Lys Phe His Cys Tyr Thr Asn His Ser Gly Ala Leu Thr Trp
                65                  70                  75

 Phe Arg Lys Arg Gly Ser Gln Gln Pro Gln Glu Leu Val Ser Glu
                80                  85                  90

 Glu Gly Arg Ile Val Gln Thr Gln Asn Gly Ser Val Tyr Thr Leu
                95                 100                 105

 Thr Ile Gln Asn Ile Gln Tyr Glu Asp Asn Gly Ile Tyr Phe Cys
                110                 115                 120

 Lys Gln Lys Cys Asp Ser Ala Asn His Asn Val Thr Asp Ser Cys
                125                 130                 135

 Gly Thr Glu Leu Leu Val Leu Gly Phe Ser Thr Leu Asp Gln Leu
                140                 145                 150

 Lys Arg Arg Asn Thr Leu Lys Asp Gly Ile Ile Leu Ile Gln Thr
                155                 160                 165

 Leu Leu Ile Ile Leu Phe Ile Ile Val Pro Ile Phe Leu Leu Leu
                170                 175                 180

 Asp Lys Asp Asp Gly Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp His Thr Tyr
```

```
                185                 190                 195

 Glu Gly Leu Asn Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu Asp Ile Val
                200                 205                 210

 Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly Glu His Pro
                215                 220                 225

 Gly Gln Glu


<210> 9
<211> 108
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 9
 Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
   1               5                  10                  15

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

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

 Leu Leu Ile Tyr Ala Ala Ser Ser Leu Glu Ser Gly Val Pro Ser
                50                  55                  60

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

 Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln
                80                  85                  90

 Tyr Asn Ser Leu Pro Trp Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu
                95                 100                 105

 Ile Lys Arg


<210> 10
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi của chuỗi nhẹ của kháng thể khảm (chMA79b)

<400> 10
 Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
   1               5                  10                  15

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

 Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Lys Pro Gly Gln
                35                  40                  45

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

 Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
                65                  70                  75
```

Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr
80 85 90

Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly Thr
95 100 105

Glu Leu Glu Leu Lys Arg
110

<210> 11
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi của chuỗi nhẹ của mảnh ghép kháng thể được nhân hoá (mảnh ghép huMA79b)

<400> 11
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 12
Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys
5 10

<210> 13
<211> 113
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 13
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Val Ser Val Ile Ser Gly Asp Gly Gly Ser Thr Tyr Tyr
50 55 60

Ala Asp Ser Val Lys Gly Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser
65 70 75

Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Gly Phe Asp Tyr Trp Gly Gln
95 100 105

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110

<210> 14
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi của chuỗi nặng của kháng thể khảm (chMA79b)

<400> 14
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 15
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Miền biến đổi của chuỗi nặng của mảnh ghép kháng thể được nhân hoá (mảnh ghép huMA79b)

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

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

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

Glu Trp Val Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

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

<400> 16
Ala Arg Ser Glu Asp Arg Tyr Arg Asn Pro Lys Gly Ser Ala Cys
1 5 10 15

Lys

<210> 17
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 17
Lys Ala Ser Lys Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 18
Ala Ala Ser Asn Arg Glu Ser
5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 19
Ala Ala Ser Asn Leu Lys Ser
5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 20
Gln Gln Ser Asn Ser Asp Pro Leu Thr
5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 21
Gln Gln Ser Asn Lys Asp Pro Leu Thr
5

<210> 22
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 22
Ala Ala Arg Lys Leu Gly Arg
5

<210> 23
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 23
Ala Ala Ser Arg Leu Glu Ser
5

<210> 24
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 24
Ala Ala Arg Lys Leu Gly Asn

5

<210> 25
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 25
Ala Ala Arg Lys Leu Lys Arg
5

<210> 26
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 26
Ala Ala Arg Tyr Leu Lys Arg
5

<210> 27
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 27
Ala Ala Arg Lys Leu Lys Ser
5

<210> 28
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 28
Ala Ala Arg Lys Leu Ala Ser
5

<210> 29
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 29
Ala Ala Gly Ile Leu Ala Arg
5

<210> 30
<211> 7

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 30
Ala Ala Arg Lys Leu Arg Ser
5

<210> 31
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 31
Ala Ala Arg Lys Leu Gly Ser
5

<210> 32
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 32
Ala Ala Arg His Leu Lys Arg
5

<210> 33
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 33
Ala Ser Arg Tyr Leu Ser Arg
5

<210> 34
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 34
Ala Gly Ser Lys Leu Leu Arg
5

<210> 35
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 35
Ala Ala Ser Asn Arg Lys Ser
5

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 36
Ala Ala Ser Lys Leu Gly Ser
5

<210> 37
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 37
Ala Ala Arg Tyr Leu Arg Arg
5

<210> 38
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 38
Ala Ala Arg Arg Leu Arg Thr
5

<210> 39
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 39
Ala Ala Arg Arg Leu Gly Arg
5

<210> 40
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 40
Ala Ala Arg Gln Arg Lys Arg

5

<210> 41
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 41
Ala Ala Arg Lys Leu Leu Arg
5

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 42
Ala Ala Arg Lys Leu Lys Asn
5

<210> 43
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 43
Ala Ala Arg Lys Leu Gly Thr
5

<210> 44
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 44
Ala Ala Arg Lys Leu Gly Gly
5

<210> 45
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 45
Ala Ala Arg Lys Leu Ala Arg
5

<210> 46
<211> 9

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 46
Gln Gln Ser Asn Ala Asp Pro Leu Thr
5

<210> 47
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 47
Gln Gln Ser Asn Gln Asp Pro Leu Thr
5

<210> 48
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 48
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 49
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 49
Gln Gln Ser Asn Asp Asp Pro Leu Thr
5

<210> 50
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 50
Gln Gln Ser Asn Leu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 51
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 51
Asn Asn Ser Asn Gly Asp Pro Leu Asn
5

<210> 52
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 52
Gln Pro Asp Asn Glu Ala Pro Arg Thr
5

<210> 53
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 53
Asp Gln Arg Asn Ala Asp Pro Leu Thr
5

<210> 54
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 54
Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 55
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 55
Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Gln
5 10

<210> 56
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 56
Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Asn

5 10

<210> 57
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 57
Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 58
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 58
Gly Tyr Thr Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 59
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 59
Gly Tyr Ser Phe Lys Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 60
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 60
Pro Tyr Ser Leu Cys Thr Tyr Phe Ile Asp
5 10

<210> 61
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 61
Gly Tyr Tyr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 62
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 62
Gly Tyr Pro Phe Gly Arg Tyr Trp Val Asn
5 10

<210> 63
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 63
Gly Tyr Thr Phe Lys Lys Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 64
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 64
Gly Tyr Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Gln
5 10

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 65
Gly Tyr Pro Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 66
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 66
Gly Tyr Pro Val Gly Arg Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 67
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 67
Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 68
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 68
Gly Tyr Gly Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 69
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 69
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Leu Ser
5 10

<210> 70
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 70
Gly Tyr Thr Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 71
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 71
Gly Tyr Thr Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 72
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Trình tự được tổng hợp

<400> 72
Gly Tyr Thr Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Asn

5 10

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 73
Gly Tyr Ser Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 74
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 74
Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 75
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 75
Gly Tyr Ser Phe Arg Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 76
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 76
Gly Tyr Ser Phe Pro Ser Tyr Trp Leu Gln
5 10

<210> 77
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 77
Gly Tyr Pro Phe Thr Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 78
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 78
Gly Tyr Pro Phe Ser Gly Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 79
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 79
Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 80
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 80
Gly Tyr Pro Phe Arg Ser Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 81
Gly Tyr Pro Phe Arg Gly Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 82
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 82
Gly Tyr Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 83
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 83
Gly Tyr Pro Phe Asn Gly Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 84
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 84
Gly Tyr Asn Val Ser Ser Tyr Trp Leu Ser
5 10

<210> 85
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 85
Gly Phe Pro Phe Thr Ser Tyr Trp Ile Ser
5 10

<210> 86
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 86
Gly Phe Pro Phe Asn Arg Tyr Trp Ile Asn
5 10

<210> 87
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 87
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp
5 10

<210> 88
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 88
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp

5 10

<210> 89
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 89
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Lys Leu Asp
5 10

<210> 90
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 90
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp
5 10

<210> 91
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 91
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp
5 10

<210> 92
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 92
Cys Thr Arg Arg Val Pro Phe Cys Leu Asp
5 10

<210> 93
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 93
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Leu Asp
5 10

<210> 94
<211> 10

<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 94
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
5 10

<210> 95
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 95
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Lys Leu Asp
5 10

<210> 96
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 96
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Phe Asp
5 10

<210> 97
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 97
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp
5 10

<210> 98
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 98
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Ser
5 10

<210> 99
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 99
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Val Leu Asp
5 10

<210> 100
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 100
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Arg Leu Asp
5 10

<210> 101
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 101
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Arg Phe Asp
5 10

<210> 102
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 102
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Phe Leu Asp
5 10

<210> 103
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 103
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Leu Asp
5 10

<210> 104
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 104
Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Tyr Phe Asp

5 10

<210> 105
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 105
Cys Thr Arg Arg Arg Pro Val Cys Leu Asp
5 10

<210> 106
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Biến thể kháng thể được nhân hoá

<400> 106
Cys Thr Arg Arg Ile Pro Val Tyr Phe Asp
5 10

<210> 107
<211> 10
<212> PRT
<213> Mus musculus

<400> 107
Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
5 10

<210> 108
<211> 87
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 108
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu
50 55 60

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 109
<211> 81
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 109
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

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

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 110
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 110
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

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

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 111
<211> 79
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 111
Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly
1 5 10 15

Ala Ser Val Lys Val Ser Cys Lys Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

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

Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 112
<211> 86
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 112
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Gly Ser Val Ser
20 25 30

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

Thr Ile Ser Val Asp Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu
50 55 60

Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
65 70 75

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 113
<211> 81
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 113
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 114
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 114
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp

35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 115
<211> 79
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 115
Gln Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Trp Ile Arg Gln Pro
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Arg Val Thr Ile Ser Val Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Gln Phe Ser Leu Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala
50 55 60

Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 116
<211> 87
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 116
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 117
<211> 81
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 117
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 118
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 118
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 119
<211> 79
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 119
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp
35 40 45

Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 120
<211> 87
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 120
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
20 25 30

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

Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
50 55 60

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
65 70 75

Arg Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
80 85

<210> 121
<211> 81
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 121
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Arg Trp Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Leu Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 122
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 122
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp

```
                35                  40                  45

 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                50                  55                  60

 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Trp Gly Gln Gly Thr Leu
                65                  70                  75

 Val Thr Val Ser Ser
                80

<210> 123
<211> 86
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 123
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
   1               5                  10                  15

 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Gly Phe Asn Ile Lys
                20                  25                  30

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

 Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
                50                  55                  60

 Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Cys Ala Arg
                65                  70                  75

 Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
                80                  85

<210> 124
<211> 81
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 124
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
   1               5                  10                  15

 Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
                20                  25                  30

 Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
                35                  40                  45

 Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
                50                  55                  60

 Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Trp Gly Gln Gly Thr
                65                  70                  75

 Leu Val Thr Val Ser Ser
                80

<210> 125
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại
```

<400> 125
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Trp Gly Gln Gly Thr Leu
65 70 75

Val Thr Val Ser Ser
80

<210> 126
<211> 79
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 126
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser Trp Val Arg Gln Ala
20 25 30

Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp
35 40 45

Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala
50 55 60

Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val
65 70 75

Thr Val Ser Ser

<210> 127
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 127
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

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

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 128
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 128
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Leu Ser Leu Pro Val Thr Pro
1 5 10 15

Gly Glu Pro Ala Ser Ile Ser Cys Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Ser Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Lys Ile Ser Arg Val
50 55 60

Glu Ala Glu Asp Val Gly Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 129
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 129
Glu Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Gly Thr Leu Ser Leu Ser Pro
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Leu Ser Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Ala Pro Arg Leu Leu Ile Tyr Gly Ile Pro Asp Arg Phe Ser
35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Arg Leu
50 55 60

Glu Pro Glu Asp Phe Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 130
<211> 80
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 130
Asp Ile Val Met Thr Gln Ser Pro Asp Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

Gly Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
20 25 30

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser

35 40 45

Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu
50 55 60

Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Phe Gly Gln Gly Thr
65 70 75

Lys Val Glu Ile Lys
80

<210> 131
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-LC của mảnh ghép huMA79b

<400> 131
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 132
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-LC của mảnh ghép huMA79b

<400> 132
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 133
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-LC của mảnh ghép huMA79b

<400> 133
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 134
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-HC của mảnh ghép huMA79b

<400> 134
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 135
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-HC của mảnh ghép huMA79b

<400> 135
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 136
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-HC của mảnh ghép huMA79b

<400> 136
Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr
5 10

<210> 137
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b. V28)

<400> 137
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 138
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b. V28)

<400> 138
Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
5 10

<210> 139
<211> 23
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 139
Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 140
<211> 15
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 140

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 141
<211> 32
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 141
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 142
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 142
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 143
<211> 25
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 143
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 144
<211> 13
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 144
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Val
5 10

<210> 145
<211> 30
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 145
Arg Phe Thr Ile Ser Arg Asp Asn Ser Lys Asn Thr Leu Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 146
<211> 11
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 146
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 147
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-HC bao gồm biến thể kháng thể được nhân hoá

<220>
<221> Xaa
<222> 6
<223> Xaa là A hoặc R

<220>
<221> Xaa
<222> 8
<223> Xaa là T hoặc N

<220>
<221> Xaa
<222> 13
<223> Xaa là A hoặc L

<400> 147
Arg Phe Thr Ile Ser Xaa Asp Xaa Ser Lys Asn Thr Xaa Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 148
<211> 31
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 148
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala

<210> 149
<211> 32
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 149
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ala Arg

<210> 150
<211> 31
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 150
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser

<210> 151
<211> 32
<212> PRT
<213> Người hiện đại

<400> 151
Arg Phe Thr Ile Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

Ser Arg

<210> 152
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 152
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 153
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-LC Biến thể kháng thể được nhân hoá huMA79b.v17)

<400> 153
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 154
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> FR3-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 154
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 155
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 155
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 156
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 156
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 157
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 157
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 158
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 158
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 159
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CL1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 159
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
65 70 75

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
80 85 90

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
95 100 105

Cys

<210> 160
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 160
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 161
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 161
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 162
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 162
Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 163
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 163
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 164
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 164
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 165
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 165
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 166
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR-H3 của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 166
Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp Tyr
5 10

<210> 167
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> CH1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 167
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
20 25 30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
35 40 45

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
50 55 60

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
65 70 75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
80 85 90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
95 100 105

Thr His Thr

<210> 168
<211> 221
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 168
Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
1 5 10 15

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
20 25 30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
35 40 45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
50 55 60

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
65 70 75

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
80 85 90

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
95 100 105

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
110 115 120

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
125 130 135

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

```
                140                 145                 150

 Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                155                 160                 165

 Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                170                 175                 180

 Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                185                 190                 195

 Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                200                 205                 210

 Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                215                 220
```

<210> 169
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC-HC Miền biến đổi của biến thể kháng thể được nhân hoá(huMA79b.v17)

<400> 169

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

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

 Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                35                  40                  45

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

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75

 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                80                  85                  90

 Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
                95                 100                 105

 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
                110
```

<210> 170
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC-Miền biến đổi của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v17)

<400> 170

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 171
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 171
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 172
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 172
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 173
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 173
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 174
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 174
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 175
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 175
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 176
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 176
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 177
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 177
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 178
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CL1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 178
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala

35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
65 70 75

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
80 85 90

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
95 100 105

Cys

<210> 179
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 179
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 180
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 180
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 181
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 181
Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 182
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 182
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 183
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 183
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 184
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 184
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 185
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 185
Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
5 10

<210> 186
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 186
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
20 25 30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
35 40 45

```
Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
                  50                  55                  60

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
                  65                  70                  75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
                  80                  85                  90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
                  95                 100                 105

Thr His Thr
```

<210> 187
<211> 221
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 187

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                  20                  25                  30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                  35                  40                  45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                  50                  55                  60

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
                  65                  70                  75

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                  80                  85                  90

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                  95                 100                 105

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                 110                 115                 120

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                 125                 130                 135

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                 140                 145                 150

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                 155                 160                 165

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                 170                 175                 180

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                 185                 190                 195

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
```

200 205 210

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
215 220

<210> 188
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC-Miền biến đổi của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 188
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 189
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC-Miền biến đổi của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v18)

<400> 189
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 190
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 190
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 191
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 191
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 192
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 192
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

<210> 193
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 193
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

<210> 194
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 194
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 195
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 195
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 196
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 196
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 197
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CL1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 197
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
65 70 75

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
80 85 90

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu

95 100 105

Cys

<210> 198
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 198
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 199
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 199
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 200
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 200
Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 201
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 201
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 202
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 202
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 203
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-HLC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 203
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 204
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 204
Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
5 10

<210> 205
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 205
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
20 25 30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
35 40 45

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
50 55 60

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
65 70 75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
80 85 90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
95 100 105

Thr His Thr

<210> 206
<211> 221
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.V28)

<400> 206

Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Leu	Leu	Gly	Gly	Pro	Ser	Val	
1			5					10							15
Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	Arg	
			20					25							30
Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	
			35					40							45
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	
			50					55							60
Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	
			65					70							75
Arg	Val	Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	
			80					85							90
Gly	Lys	Glu	Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Pro	Ala	
			95					100							105
Pro	Ile	Glu	Lys	Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	
			110					115							120
Pro	Gln	Val	Tyr	Thr	Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Glu	Glu	Met	Thr	Lys	
			125					130							135
Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Thr	Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	
			140					145							150
Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu	Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	
			155					160							165
Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu	Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	
			170					175							180
Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys	Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	
			185					190							195
Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu	Ala	Leu	His	Asn	His	
			200					205							210
Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly					
			215					220							

<210> 207
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC-miền biến đổi của (huMA79b.v28)

<400> 207
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 208
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC-Miền biến đổi của kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v28)

<400> 208
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 209
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 209
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

Gly Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

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

<220>
<223> FR2-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 210
Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 211
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 211
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
1 5 10 15

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
20 25 30

Tyr Cys

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

<220>
<223> FR4-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 212
Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
5 10

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

<220>
<223> HVR1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 213
Lys Ala Ser Gln Ser Val Asp Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn
1 5 10 15

<210> 214
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 214
Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
5

<210> 215
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 215
Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr
5

<210> 216
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CL1-LC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 216
Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
1 5 10 15

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn
20 25 30

Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala
35 40 45

Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser
50 55 60

Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys
65 70 75

Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His
80 85 90

Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu
95 100 105

Cys

<210> 217
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 217
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

Gly Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Ala Ser
20 25

<210> 218
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR2-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 218
Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile
5 10

<210> 219
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR3-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 219
Arg Ala Thr Phe Ser Ala Asp Thr Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu
1 5 10 15

Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 220
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> FR4-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 220
Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
5 10

<210> 221
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 221
Gly Tyr Thr Phe Ser Ser Tyr Trp Ile Glu
5 10

<210> 222
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR2-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 222
Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr Asn Glu Ile
1 5 10 15

Phe Lys Gly

<210> 223
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HVR3-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 223
Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp Tyr
5 10

<210> 224
<211> 108
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> CH1-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 224
Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser
1 5 10 15

Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
20 25 30

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala
35 40 45

Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser
50 55 60

Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser
65 70 75

Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser
80 85 90

Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
95 100 105

Thr His Thr

<210> 225
<211> 221
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Fc-HC của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 225

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

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
            20                  25                  30

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            35                  40                  45

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            50                  55                  60

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
            65                  70                  75

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
            80                  85                  90

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
            95                  100                 105

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
            110                 115                 120

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
            125                 130                 135

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
            140                 145                 150

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
            155                 160                 165

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
            170                 175                 180

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
            185                 190                 195

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
            200                 205                 210

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
            215                 220
```

<210> 226
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> LC -Miền biến đổi của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 226

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

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

Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
            35                  40                  45

Lys Ala Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
```

50 55 60

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg
110

<210> 227
<211> 117
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> HC-Miền biến đổi của biến thể kháng thể được nhân hoá (huMA79b.v32)

<400> 227
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
110 115

<210> 228
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-huMA79b.v17-HC(A118C) Biến thể - HC

<400> 228
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

```
Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
                50                  55                  60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                80                  85                  90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
                95                 100                 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr
               110                 115                 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
               125                 130                 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
               140                 145                 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
               155                 160                 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
               170                 175                 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
               185                 190                 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
               200                 205                 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
               215                 220                 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
               230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
               245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
               260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
               275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
               290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
               305                 310                 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
               320                 325                 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
               335                 340                 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
               350                 355                 360
```

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
380 385 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410 415 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 229
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-huMA79b.v17-HC(A118C) Biến thể - LC

<400> 229
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

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

185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 230
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-huMA79b.v18-HC(All8C) Biến thể - HC

<400> 230
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr
110 115 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
125 130 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
140 145 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
155 160 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
170 175 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
185 190 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
200 205 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
215 220 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
320 325 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
335 340 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
350 355 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
380 385 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410 415 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 231
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-huMA79b.v18-HC(A118C) Biến thể - LC

<400> 231
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

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

```
Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                  65                  70                  75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                  80                  85                  90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
                  95                 100                 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
                 110                 115                 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
                 125                 130                 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
                 140                 145                 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
                 155                 160                 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
                 170                 175                 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
                 185                 190                 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
                 200                 205                 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
                 215

<210> 232
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-huMA79b.v28-HC(A118C) Biến thể - HC

<400> 232
 Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
   1               5                  10                  15

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

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

 Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
                  50                  55                  60

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

 Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                  80                  85                  90

 Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
                  95                 100                 105

 Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr
```

```
                110                 115                 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
                125                 130                 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
                140                 145                 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                155                 160                 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                170                 175                 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
                185                 190                 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
                200                 205                 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
                215                 220                 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
                230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
                290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                305                 310                 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                320                 325                 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                335                 340                 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                350                 355                 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                365                 370                 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                380                 385                 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                395                 400                 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                410                 415                 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                425                 430                 435
```

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 233
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-huMA79b.v28-HC(All8C) Biến thể - LC

<400> 233
Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
1 5 10 15

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

Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 234
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> ThioMAb-chMA79b- LC(V205C) Biến thể - HC

<400> 234

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
            50                  55                  60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser
            65                  70                  75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
            80                  85                  90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
            95                  100                 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
            110                 115                 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
            125                 130                 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
            140                 145                 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
            155                 160                 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
            170                 175                 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
            185                 190                 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
            200                 205                 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
            215                 220                 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
            230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
            245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
            260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
            290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
```

305 310 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
320 325 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
335 340 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
350 355 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
380 385 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410 415 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 235
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-chMA79b- LC(V205C) Biến thể - LC

<400> 235
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
95 100 105

Thr Glu Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 236
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-chMA79b- HC(A118C) Biến thể - HC

<400> 236
Glu Val Gln Leu Gln Gln Ser Gly Ala Glu Leu Met Lys Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

Asn Glu Ile Phe Lys Gly Lys Ala Thr Phe Thr Ala Asp Thr Ser
65 70 75

Ser Asn Thr Ala Tyr Met Gln Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Ser Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Ser Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr
110 115 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
125 130 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
140 145 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
155 160 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
170 175 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
185 190 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
200 205 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
215 220 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
275 280 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
290 295 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
305 310 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
320 325 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
335 340 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
350 355 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
365 370 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
380 385 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
395 400 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
410 415 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
425 430 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440 445

<210> 237
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> ThioMAb-chMA79b- HC(A118C) Biến thể - LC

<400> 237
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ala Val Ser Leu

```
  1               5                  10                  15

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                35                  40                  45

Gln Pro Pro Lys Leu Phe Ile Tyr Ala Ala Ser Asn Leu Glu Ser
                50                  55                  60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75

Thr Leu Asn Ile His Pro Val Glu Glu Glu Asp Ala Ala Thr Tyr
                80                  85                  90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Ala Gly
                95                 100                 105

Thr Glu Leu Glu Leu Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
               110                 115                 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
               125                 130                 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
               140                 145                 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
               155                 160                 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
               170                 175                 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
               185                 190                 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
               200                 205                 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
               215
```

<210> 238
<211> 893
<212> ADN
<213> Macaca fascicularis

<400> 238

```
tcatggtgat ggtgatgatg accggtacgc gtagaatcga gaccgaggag 50

agggttaggg ataggcttac cttcgaaccg cgggccctct agactcgagc 100

ggccgccact gtgctggata tctgcagaat tgcccttggg gacagagcag 150

tgaccatggc caggctggcg ttgtctcctg tgtccagcca ctggctggtg 200

gcgttgctgc tgctgctctc agcagctgag ccagtgccag cagccaaatc 250

agaggacctg tacccgaatc ccaaaggtag tgcttgttct cggatctggc 300

agagcccacg tttcatagcc aggaaacggg gcttcacggt gaaaatgcac 350
```

tgctacgtga ccaacagcac cttcagcatc gtgagctggc tccggaagcg 400

ggagacggac aaggagcccc aacaggtgaa cctggagcag ggccacatgc 450

atcagaccca aaacagctct gtcaccaccc tcatcatcca agacatccgg 500

tttgaggaca acggcatcta cttctgtcag caggagtgca gcaagacctc 550

ggaggtctac cggggctgcg gcacggagct gcgagtcatg gggttcagca 600

ccttggcaca gctgaagcag aggaacacgc tgaaggatgg catcatcatg 650

atccagacgc tgctgatcat cctcttcatc atcgtgccca tcttcctgct 700

gctggacaag gatgacagca aggccggcat ggaggaagat cacacctacg 750

agggcctgga cattgaccag acggccacct acgaggacat agtgacgctg 800

cggacagggg aagtgaagtg gtctgtgggt gagcacccag gtcaggagtg 850

agagccagga cctccccacg gcctgggtgc aggctcccca gcc 893

<210> 239
<211> 231
<212> PRT
<213> Macaca fascicularis

<400> 239

Met	Ala	Arg	Leu	Ala	Leu	Ser	Pro	Val	Ser	Ser	His	Trp	Leu	Val	
1				5				10						15	
Ala	Leu	Leu	Leu	Leu	Leu	Ser	Ala	Ala	Glu	Pro	Val	Pro	Ala	Ala	
				20				25						30	
Lys	Ser	Glu	Asp	Leu	Tyr	Pro	Asn	Pro	Lys	Gly	Ser	Ala	Cys	Ser	
				35				40						45	
Arg	Ile	Trp	Gln	Ser	Pro	Arg	Phe	Ile	Ala	Arg	Lys	Arg	Gly	Phe	
				50				55						60	
Thr	Val	Lys	Met	His	Cys	Tyr	Val	Thr	Asn	Ser	Thr	Phe	Ser	Ile	
				65				70						75	
Val	Ser	Trp	Leu	Arg	Lys	Arg	Glu	Thr	Asp	Lys	Glu	Pro	Gln	Gln	
				80				85						90	
Val	Asn	Leu	Glu	Gln	Gly	His	Met	His	Gln	Thr	Gln	Asn	Ser	Ser	
				95				100						105	
Val	Thr	Thr	Leu	Ile	Ile	Gln	Asp	Ile	Arg	Phe	Glu	Asp	Asn	Gly	
				110				115						120	
Ile	Tyr	Phe	Cys	Gln	Gln	Glu	Cys	Ser	Lys	Thr	Ser	Glu	Val	Tyr	
				125				130						135	
Arg	Gly	Cys	Gly	Thr	Glu	Leu	Arg	Val	Met	Gly	Phe	Ser	Thr	Leu	
				140				145						150	
Ala	Gln	Leu	Lys	Gln	Arg	Asn	Thr	Leu	Lys	Asp	Gly	Ile	Ile	Met	
				155				160						165	
Ile	Gln	Thr	Leu	Leu	Ile	Ile	Leu	Phe	Ile	Ile	Val	Pro	Ile	Phe	
				170				175						180	

Leu Leu Leu Asp Lys Asp Asp Ser Lys Ala Gly Met Glu Glu Asp
185 190 195

His Thr Tyr Glu Gly Leu Asp Ile Asp Gln Thr Ala Thr Tyr Glu
200 205 210

Asp Ile Val Thr Leu Arg Thr Gly Glu Val Lys Trp Ser Val Gly
215 220 225

Glu His Pro Gly Gln Glu
230

<210> 240
<211> 800
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng-xyno CD79b khảm (ch10D10)- LC

<400> 240
acctcggttc tatcgattga attccaccat gggatggtca tgtatcatcc 50

tttttctagt agcaactgca actggagtac attcagatat cgtgctgacc 100

caatctccac cctctttggc tgtgtctcta gggcagaggg ccaccatatc 150

ctgcagagcc agtgaaagtg ttgatagtta tggcaaaact tttatgcact 200

ggcaccagca gaaaccagga cagccaccca aactcctcat ctatcgtgta 250

tccaacctag aatctgggat ccctgccagg ttcagtggca gtgggtcaag 300

gacagacttc accctcacca ttaatcctgt ggaggctgat gatgttgcaa 350

cctattactg tcagcaaagt aatgaggatc cgttcacgtt cggtggaggc 400

accaagctgg aaatcaaacg gaccgtggct gcaccatctg tcttcatctt 450

cccgccatct gatgagcagt tgaaatctgg aactgcctct gttgtgtgcc 500

tgctgaataa cttctatccc agagaggcca aagtacagtg gaaggtggat 550

aacgccctcc aatcgggtaa ctcccaggag agtgtcacag agcaggacag 600

caaggacagc acctacagcc tcagcagcac cctgacgctg agcaaagcag 650

actacgagaa acacaaagtc tacgcctgcg aagtcaccca tcagggcctg 700

agctcgcccg tcacaaagag cttcaacagg ggagagtgtt aagcttggcc 750

gccatggccc aacttgttta ttgcagctta taatggttac aaataaagca 800

<210> 241
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng-xyno CD79b khảm (ch10D10)- LC

<400> 241
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

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

Ser Tyr Gly Lys Thr Phe Met His Trp His Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
95 100 105

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 242
<211> 1500
<212> ADN
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng-xyno CD79b khảm (ch10D10)- LC

<400> 242
cacctcggtt ctatcgattg aattccacca tgggatggtc atgtatcatc 50

ctttttctag tagcaactgc aactggagta cattcagaag ttcagctgca 100

ggagtcggga cctggcctgg tgaaaccttc tcagtctctg tccctcacct 150

gcactgtcac tggctactca atcaccagtg attatgcctg gaactggatc 200

cggcagtttc caggaaacaa actggagtgg atgggcaaca tatggtacag 250

tggtagcact acctacaacc catctctcaa aagtcgaatc tctatcactc 300

gagacacatc caagaaccag ttcttcctgc agttgaattc tgtgacttct 350

gaggacacag ccacatatta ctgttcaaga atggacttct ggggtcaagg 400

caccactctc acagtctcct cagcctccac caagggccca tcggtcttcc 450

ccctggcacc ctcctccaag agcacctctg ggggcacagc ggccctgggc 500

tgcctggtca aggactactt ccccgaaccg gtgacggtgt cgtggaactc 550

aggcgccctg accagcggcg tgcacacctt cccggctgtc ctacagtcct 600

caggactcta ctccctcagc agcgtggtga ctgtgccctc tagcagcttg 650

ggcacccaga cctacatctg caacgtgaat cacaagccca gcaacaccaa 700

ggtggacaag aaagttgagc ccaaatcttg tgacaaaact cacacatgcc 750

caccgtgccc agcacctgaa ctcctggggg gaccgtcagt cttcctcttc 800

cccccaaaac ccaaggacac cctcatgatc tcccggaccc ctgaggtcac 850

atgcgtggtg gtggacgtga gccacgaaga ccctgaggtc aagttcaact 900

ggtacgtgga cggcgtggag gtgcataatg ccaagacaaa gccgcgggag 950

gagcagtaca acagcacgta ccgtgtggtc agcgtcctca ccgtcctgca 1000

ccaggactgg ctgaatggca aggagtacaa gtgcaaggtc tccaacaaag 1050

ccctcccagc ccccatcgag aaaaccatct ccaaagccaa agggcagccc 1100

cgagaaccac aggtgtacac cctgccccca tcccgggaag agatgaccaa 1150

gaaccaggtc agcctgacct gcctggtcaa aggcttctat cccagcgaca 1200

tcgccgtgga gtgggagagc aatgggcagc cggagaacaa ctacaagacc 1250

acgcctcccg tgctggactc cgacggctcc ttcttcctct acagcaagct 1300

caccgtggac aagagcaggt ggcagcaggg gaacgtcttc tcatgctccg 1350

tgatgcatga ggctctgcac aaccactaca cgcagaagag cctctccctg 1400

tctccgggta aatgagtgcg acggccctag agtcgacctg cagaagcttg 1450

gccgccatgg cccaacttgt ttattgcagc ttataatggt tacaaataaa 1500

<210> 243
<211> 441
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Kháng-xyno CD79b khảm (ch10D10)- LC

<400> 243

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

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys

```
                35                  40                  45

Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr
                50                  55                  60

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

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp
                80                  85                  90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly
                95                 100                 105

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
               110                 115                 120

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
               125                 130                 135

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
               140                 145                 150

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
               155                 160                 165

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
               170                 175                 180

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
               185                 190                 195

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
               200                 205                 210

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
               215                 220                 225

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
               230                 235                 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
               245                 250                 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
               260                 265                 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
               275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
               290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
               305                 310                 315

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
               320                 325                 330

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
               335                 340                 345

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
               350                 355                 360
```

```
Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
                365                 370                 375

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
                380                 385                 390

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
                395                 400                 405

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
                410                 415                 420

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
                425                 430                 435

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                440
```

<210> 244
<211> 441
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-MAb-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) Biến thể - HC

<400> 244

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

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
                20                  25                  30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
                35                  40                  45

Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr
                50                  55                  60

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

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp
                80                  85                  90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly
                95                  100                 105

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
                110                 115                 120

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
                125                 130                 135

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
                140                 145                 150

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
                155                 160                 165

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
                170                 175                 180
```

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
185 190 195

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
200 205 210

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
215 220 225

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
230 235 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
245 250 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
260 265 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
275 280 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
290 295 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
305 310 315

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
320 325 330

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
335 340 345

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
350 355 360

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
365 370 375

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
380 385 390

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
395 400 405

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
410 415 420

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
425 430 435

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440

<210> 245
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-MAb-kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C) Biến thể - LC

<400> 245
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu

```
  1               5                  10                  15

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

Ser Tyr Gly Lys Thr Phe Met His Trp His Gln Gln Lys Pro Gly
                35                  40                  45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Glu Ser
                50                  55                  60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
                65                  70                  75

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
                80                  85                  90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
                95                 100                 105

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
               110                 115                 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
               125                 130                 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
               140                 145                 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
               155                 160                 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
               170                 175                 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
               185                 190                 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
               200                 205                 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
               215

<210> 246
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit gắn kết albumin

<400> 246
 Cys Asp Lys Thr His Thr Gly Gly Gly Ser Gln Arg Leu Met Glu
   1               5                  10                  15

 Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp Glu Asp Asp Phe
                20                  25                  30

<210> 247
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo
```

<220>
<223> Peptit gắn kết albumin

<400> 247
Gln Arg Leu Met Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 248
<211> 20
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit gắn kết albumin

<400> 248
Gln Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu
1 5 10 15

Trp Glu Asp Asp Phe
20

<210> 249
<211> 18
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit gắn kết albumin

<400> 249
Arg Leu Ile Glu Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
1 5 10 15

Glu Asp Asp

<210> 250
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Peptit gắn kết albumin

<400> 250
Asp Ile Cys Leu Pro Arg Trp Gly Cys Leu Trp
5 10

<210> 251
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b HC-Biến thể

<400> 251
Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Gly Gly
5 10

<210> 252
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b HC-Biến thể

<400> 252
Leu Arg Leu Ser Cys Cys Ala Ser Gly Tyr Thr
5 10

<210> 253
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b HC-Biến thể

<400> 253
Met Asn Ser Leu Arg Cys Glu Asp Thr Ala Val
5 10

<210> 254
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b HC-Biến thể

<400> 254
Thr Leu Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
5 10

<210> 255
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b HC-Biến thể

<400> 255
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
5 10

<210> 256
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b HC-Biến thể

<400> 256
Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
5 10

<210> 257
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b HC-Biến thể

<400> 257
Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
5 10

<210> 258
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b HC-Biến thể

<400> 258
Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
5 10

<210> 259
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 259
Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
5 10

<210> 260
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 260
Glu Val Gln Leu Cys Gln Ser Gly Ala Glu
5 10

<210> 261
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 261
Val Lys Ile Ser Cys Cys Ala Thr Gly Tyr Thr
5 10

<210> 262
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 262
Leu Ser Ser Leu Thr Cys Glu Asp Ser Ala Val
5 10

<210> 263
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 263
Thr Ser Val Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
5 10

<210> 264
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 264
Val Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
5 10

<210> 265
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 265
Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
5 10

<210> 266
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 266
Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
5 10

<210> 267
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 267
Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
5 10

<210> 268
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b HC-Biến thể

<400> 268
Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
5 10

<210> 269
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 269
Glu Val Gln Leu Cys Glu Ser Gly Pro Gly
5 10

<210> 270
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 270
Leu Ser Leu Thr Cys Cys Val Thr Gly Tyr Ser
5 10

<210> 271
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 271
Leu Asn Ser Val Thr Cys Glu Asp Thr Ala Thr
5 10

<210> 272
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 272
Thr Thr Leu Thr Val Cys Ser Ala Ser Thr Lys
5 10

<210> 273
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 273
Leu Thr Val Ser Ser Cys Ser Thr Lys Gly Pro
5 10

<210> 274
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 274
Val Ser Ser Ala Ser Cys Lys Gly Pro Ser Val
5 10

<210> 275
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-kháng-xynoCD79b (ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 275
Trp Tyr Val Asp Gly Cys Glu Val His Asn Ala
5 10

<210> 276
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 276
Lys Gly Phe Tyr Pro Cys Asp Ile Ala Val Glu
5 10

<210> 277
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 277
Pro Pro Val Leu Asp Cys Asp Gly Ser Phe Phe
5 10

<210> 278
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b LC-Biến thể

<400> 278
Ser Leu Ser Ala Ser Cys Gly Asp Arg Val Thr
5 10

<210> 279
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b LC-Biến thể

<400> 279
Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
5 10

<210> 280
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b LC-Biến thể

<400> 280
Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
5 10

<210> 281
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b LC-Biến thể

<400> 281
Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 282
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b LC-Biến thể

<400> 282
Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 283
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b LC-Biến thể

<400> 283
Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
5 10

<210> 284
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-huMA79b LC-Biến thể

<400> 284
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
5 10

<210> 285
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b LC-Biến thể

<400> 285
Ser Leu Ala Val Ser Cys Gly Gln Arg Ala Thr
5 10

<210> 286
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b LC-Biến thể

<400> 286
Glu Leu Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
5 10

<210> 287
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b LC-Biến thể

<400> 287
Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
5 10

<210> 288
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b LC-Biến thể

<400> 288
Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 289
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b LC-Biến thể

<400> 289
Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 290
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b LC-Biến thể

<400> 290
Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
5 10

<210> 291
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio-chMA79b LC-Biến thể

<400> 291
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
5 10

<210> 292
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 292
Ser Leu Ala Val Ser Cys Gly Gln Arg Ala Thr
5 10

<210> 293
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 293
Glu Ile Lys Arg Thr Cys Ala Ala Pro Ser Val
5 10

<210> 294
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 294
Thr Val Ala Ala Pro Cys Val Phe Ile Phe Pro
5 10

<210> 295
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 295
Phe Ile Phe Pro Pro Cys Asp Glu Gln Leu Lys
5 10

<210> 296
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 296
Asp Glu Gln Leu Lys Cys Gly Thr Ala Ser Val
5 10

<210> 297
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 297
Val Thr Glu Gln Asp Cys Lys Asp Ser Thr Tyr
5 10

<210> 298
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-HC-Biến thể

<400> 298
Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr Lys Ser Phe Asn
5 10

<210> 299
<211> 441
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b-LC(V205C) Biến thể - HC

<400> 299
Asp Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

```
Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
                20                  25                  30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
                35                  40                  45

Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr
                50                  55                  60

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

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp
                80                  85                  90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly
                95                 100                 105

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val
               110                 115                 120

Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala
               125                 130                 135

Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr
               140                 145                 150

Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe
               155                 160                 165

Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val
               170                 175                 180

Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys
               185                 190                 195

Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys Lys Val
               200                 205                 210

Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro
               215                 220                 225

Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro
               230                 235                 240

Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg Thr Pro Glu Val Thr
               245                 250                 255

Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp Pro Glu Val Lys Phe
               260                 265                 270

Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn Ala Lys Thr Lys
               275                 280                 285

Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val Val Ser Val
               290                 295                 300

Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu Tyr Lys
               305                 310                 315

Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala Pro Ile Glu Lys Thr
               320                 325                 330

Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr
```

335 340 345

Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu
350 355 360

Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
365 370 375

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro
380 385 390

Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu
395 400 405

Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys
410 415 420

Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser
425 430 435

Leu Ser Leu Ser Pro Gly
440

<210> 300
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Thio kháng-xynoCD79b(ch10D10)-LC(V205C) Biến thể - LC

<400> 300
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

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

Ser Tyr Gly Lys Thr Phe Met His Trp His Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Glu Ser
50 55 60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
65 70 75

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
95 100 105

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Cys Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 301
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> kháng-xynoCD79b (ch10D10) - miền biến đổi của HC

<400> 301
Glu Val Gln Leu Gln Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser
1 5 10 15

Gln Ser Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Thr Gly Tyr Ser Ile Thr
20 25 30

Ser Asp Tyr Ala Trp Asn Trp Ile Arg Gln Phe Pro Gly Asn Lys
35 40 45

Leu Glu Trp Met Gly Asn Ile Trp Tyr Ser Gly Ser Thr Thr Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Gln Phe Phe Leu Gln Leu Asn Ser Val Thr Ser Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Thr Tyr Tyr Cys Ser Arg Met Asp Phe Trp Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser
110

<210> 302
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> kháng-xynoCD79b (ch10D10) - miền biến đổi của LC

<400> 302
Asp Ile Val Leu Thr Gln Ser Pro Pro Ser Leu Ala Val Ser Leu
1 5 10 15

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

Ser Tyr Gly Lys Thr Phe Met His Trp His Gln Gln Lys Pro Gly
35 40 45

```
Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Arg Val Ser Asn Leu Glu Ser
                50                  55                  60

Gly Ile Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Arg Thr Asp Phe
                65                  70                  75

Thr Leu Thr Ile Asn Pro Val Glu Ala Asp Asp Val Ala Thr Tyr
                80                  85                  90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Phe Thr Phe Gly Gly Gly
                95                 100                 105

Thr Lys Leu Glu Ile Lys Arg
               110
```

<210> 303
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của huMA79bv.17

<400> 303

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

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

Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                35                  40                  45

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

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                80                  85                  90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
                95                 100                 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
               110                 115                 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
               125                 130                 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
               140                 145                 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
               155                 160                 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
               170                 175                 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
               185                 190                 195

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

200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 304
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của huMA79bv.17

<400> 304
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Val Tyr Phe Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
110 115 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
125 130 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
140 145 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
155 160 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
170 175 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
185 190 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
200 205 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
215 220 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
230 235 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
245 250 255

```
Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
                290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                305                 310                 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                320                 325                 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                335                 340                 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                350                 355                 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                365                 370                 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                380                 385                 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                395                 400                 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                410                 415                 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                425                 430                 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                440                 445

<210> 305
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của huMA79bv.18

<400> 305
 Asp Ile Gln Leu Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val
   1               5                  10                  15

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

 Tyr Asp Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                  35                  40                  45

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

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                  65                  70                  75
```

Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
80 85 90

Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
95 100 105

Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
110 115 120

Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
125 130 135

Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
140 145 150

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 306
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của huMA79bv.18

<400> 306
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
110 115 120

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

```
                125                 130                 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
                140                 145                 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
                155                 160                 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
                170                 175                 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
                185                 190                 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
                200                 205                 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
                215                 220                 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
                230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
                290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                305                 310                 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                320                 325                 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                335                 340                 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                350                 355                 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                365                 370                 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                380                 385                 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                395                 400                 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                410                 415                 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                425                 430                 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                440                 445
```

<210> 307
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của huMA79bv.28

<400> 307

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

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

 Tyr Glu Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                35                  40                  45

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

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75

 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                80                  85                  90

 Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
                95                 100                 105

 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
               110                 115                 120

 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
               125                 130                 135

 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
               140                 145                 150

 Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
               155                 160                 165

 Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
               170                 175                 180

 Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
               185                 190                 195

 Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
               200                 205                 210

 Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
               215
```

<210> 308
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của huMA79bv.28

<400> 308

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

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
    50                  55                  60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
                80                  85                  90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
            95                  100                 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
        110                 115                 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
    125                 130                 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
140                 145                 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
            155                 160                 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
        170                 175                 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
    185                 190                 195

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
200                 205                 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
            215                 220                 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
        230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
    245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
            275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
        290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
    305                 310                 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
```

```
                320                 325                 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                335                 340                 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                350                 355                 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                365                 370                 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                380                 385                 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                395                 400                 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                410                 415                 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                425                 430                 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                440                 445
```

<210> 309
<211> 218
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nhẹ của huMA79bv.32

<400> 309

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

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

 Tyr Ser Gly Asp Ser Phe Leu Asn Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly
                35                  40                  45

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

 Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe
                65                  70                  75

 Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr
                80                  85                  90

 Tyr Cys Gln Gln Ser Asn Glu Asp Pro Leu Thr Phe Gly Gln Gly
                95                 100                 105

 Thr Lys Val Glu Ile Lys Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe
                110                 115                 120

 Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser
                125                 130                 135

 Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val
                140                 145                 150
```

Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
155 160 165

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser
170 175 180

Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
185 190 195

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr
200 205 210

Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
215

<210> 310
<211> 446
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> Chuỗi nặng của huMA79bv.32

<400> 310
Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Gly Gly Leu Val Gln Pro Gly
1 5 10 15

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

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

Glu Trp Ile Gly Glu Ile Leu Pro Gly Gly Gly Asp Thr Asn Tyr
50 55 60

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

Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp
80 85 90

Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Thr Arg Arg Val Pro Ile Arg Leu Asp
95 100 105

Tyr Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr
110 115 120

Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr
125 130 135

Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr Phe
140 145 150

Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
155 160 165

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr
170 175 180

Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
185 190 195

```
Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys
                200                 205                 210

Val Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys Thr His Thr
                215                 220                 225

Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Leu Leu Gly Gly Pro Ser Val
                230                 235                 240

Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser Arg
                245                 250                 255

Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
                260                 265                 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His
                275                 280                 285

Asn Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr
                290                 295                 300

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn
                305                 310                 315

Gly Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Pro Ala
                320                 325                 330

Pro Ile Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu
                335                 340                 345

Pro Gln Val Tyr Thr Leu Pro Pro Ser Arg Glu Glu Met Thr Lys
                350                 355                 360

Asn Gln Val Ser Leu Thr Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser
                365                 370                 375

Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn
                380                 385                 390

Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe
                395                 400                 405

Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly
                410                 415                 420

Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu Ala Leu His Asn His
                425                 430                 435

Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
                440                 445
```

CAGGGGACAGGCTGCAGCCGGTGCAGTTACACGTTTTCCTCCAAGGAGCCTCGGACGTTG
TCACGGGTTTGGGGTCGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGT
GCCCAGCCACTGGATGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCTGAGCCAGTACCAGCAGC
CAGATCGGAGGACCGGTACCGGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCGCGGATCTGGCAGAG
CCCACGTTTCATAGCCAGGAAACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACATGAACAG
CGCCTCCGGCAATGTGAGCTGGCTCTGGAAGCAGGAGATGGACGAGAATCCCCAGCAGCT
GAAGCTGGAAAAGGGCCGCATGGAAGAGTCCCAGAACGAATCTCTCGCCACCCTCACCAT
CCAAGGCATCCGGTTTGAGGACAATGGCATCTACTTCTGTCAGCAGAAGTGCAACAACAC
CTCGGAGGTCTACCAGGGCTGCGGCACAGAGCTGCGAGTCATGGGATTCAGCACCTTGGC
ACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGTATCATCATGATCCAGACGCTGCTGAT
CATCCTCTTCATCATCGTGCCTATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGACAGCAAGGCTGG
CATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACAGCCACCTATGAGGA
CATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTAGGTGAGCACCCAGGCCAGGA
GTGAGAGCCAGGTCGCCCCATGACCTGGGTGCAGGCTCCCTGGCCTCAGTGACTGCTTCG
GAGCTGCCTGGCTCATGGCCCAACCCCTTTCCTGGACCCCCCAGCTGGCCTCTGAAGCTG
GCCCACCAGAGCTGCCATTTGTCTCCAGCCCCTGGTCCCCAGCTCTTGCCAAAGGGCCTG
GAGTAGAAGGACAACAGGGCAGCAACTTGGAGGGAGTTCTCTGGGGATGGACGGGACCCA
GCCTTCTGGGGGTGCTATGAGGTGATCCGTCCCCACACATGGGATGGGGGAGGCAGAGAC
TGGTCCAGAGCCCGCAAATGGACTCGGAGCCGAGGGCCTCCCAGCAGAGCTTGGGAAGGG
CCATGGACCCAACTGGGCCCCAGAAGAGCCACAGGAACATCATTCCTCTCCCGCAACCAC
TCCCACCCCAGGGAGGCCCTGGCCTCCAGTGCCTTCCCCCGTGGAATAAACGGTGTGTCC
TGAGAAACCA

FIG. 1

ADN 225786

MARLALSPVPSHWMVALLLLLSAEPVPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYMNSASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEESQNESLATLTIQGIRFEDNGIY
FCQQKCNNTSEVYQGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLL
LDKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Trình tự tín hiệu.
các axit amin 1-28.
Miền chuyển màng.
các axit amin 5-25, 159-179.
Miền globulin miễn dịch.
các axit amin 58-124.
Motif hoạt hoá dựa trên tyrosin thụ thể miễn dịch.
các axit amin 193-213.
Vị trí N-glycosyl hoá.
các axit amin 73-76, 101-104, 127-130, 128-131.
Vị trí phosphoryl hoá protein kinaza C.
các axit amin 49-51, 60-62, 156-158, 212-214.
Vị trí phoshoryl hoá casein kinaza II
các axit amin 99-102, 156-159, 206-209, 221-224.
Vị trí phosphoryl hoá tyrosin kinaza.
các axit amin 113-120.
Vị trí N-myristoyl hoá.
các axit amin 40-45, 118-123.

FIG. 2

Chuỗi nhẹ kháng CD79b của người khảm (chMA79b)

CACTCCCAGCTCCAACTGCACCTCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGT
ATCATCCTTTTTCTAGTAGCAACTGCAACTGGAGTACATTCAGATATCGTGCTGACCCAATC
TCCAGCTTCTTTGGCTGTGTCTCTGGGGCAGAGGGCCACCATCTCCTGCAAGGCCAGCCAAA
GTGTTGATTATGATGGTGATAGTTTTTTGAACTGGTACCAACAGAAACCAGGACAGCCACCC
AAACTCTTCATCTATGCTGCATCCAATCTAGAATCTGGGATCCCAGCCAGGTTTAGTGGCAG
TGGGTCTGGGACAGACTTCACCCTCAACATCCATCCTGTGGAGGAGGAGGATGCTGCAACCT
ATTACTGTCAGCAAAGTAATGAGGATCCGCTCACGTTCGGGGCAGGCACCGAGCTGGAACTC
AAACGGACCGTGGCTGCACCATCTGTCTTCATCTTCCCGCCATCTGATGAGCAGTTGAAATC
TGGAACTGCCTCTGTTGTGTGCCTGCTGAATAACTTCTATCCCAGAGAGGCCAAAGTACAGT
GGAAGGTGGATAACGCCCTCCAATCGGGTAACTCCCAGGAGAGTGTCACAGAGCAGGACAGC
AAGGACAGCACCTACAGCCTCAGCAGCACCCTGACGCTGAGCAAAGCAGACTACGAGAAACA
CAAAGTCTACGCCTGCGAAGTCACCCATCAGGGCCTGAGCTCGCCCGTCACAAAGAGCTTCA
ACAGGGGAGAGTGTTAAGCTTGGCCGCCATGGCCCAACTTGTTTATTGCAGCTTATAATGGT
TACAAATAAAGCAATAGCATCACAAATTTCACAAATAAAGCATTTTTTTCACTGCATTCTAG
TTGTGGTTTGTCCAAACTCATCAATGTATCTTATCATGTCTGGATCGGGAATTAATTCGGC

FIG. 3

Chuỗi nhẹ kháng CD79b của người khảm (chMA79b)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGQPPKLFIYAASNLES
GIPARFSGSGSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVF
IFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLS
STLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 4

Chuỗi nặng kháng CD79b của người khảm (chMA79b)

TCGGTTCTATCGATTGAATTCCACCATGGGATGGTCATGTATCATCCTTTTTCTAGTAGCAA
CTGCAACTGGAGTACATTCAGAAGTTCAGCTGCAGCAGTCTGGGGCTGAACTGATGAAGCCT
GGGGCCTCAGTGAAGATATCCTGCAAGGCTACTGGCTACACATTCAGTAGTTACTGGATAGA
GTGGGTAAAGCAGAGGCCTGGACATGGCCTTGAGTGGATTGGAGAGATTTTACCTGGAGGTG
GTGATACTAACTACAATGAGATTTTCAAGGGCAAGGCCACATTCACTGCAGATACATCCTCC
AACACAGCCTACATGCAACTCAGCAGCCTGACATCTGAGGACTCTGCCGTCTATTACTGTAC
AAGACGAGTACCGGTTTACTTTGACTACTGGGGCCAAGGAACCTCAGTCACCGTCTCCTCAG
CCTCCACCAAGGGCCCATCGGTCTTCCCCCTGGCACCCTCCTCCAAGAGCACCTCTGGGGGC
ACAGCGGCCCTGGGCTGCCTGGTCAAGGACTACTTCCCCGAACCGGTGACGGTGTCGTGGAA
CTCAGGCGCCCTGACCAGCGGCGTGCACACCTTCCCGGCTGTCCTACAGTCCTCAGGACTCT
ACTCCCTCAGCAGCGTGGTGACTGTGCCCTCTAGCAGCTTGGGCACCCAGACCTACATCTGC
AACGTGAATCACAAGCCCAGCAACACCAAGGTGGACAAGAAAGTTGAGCCCAAATCTTGTGA
CAAAACTCACACATGCCCACCGTGCCCAGCACCTGAACTCCTGGGGGGACCGTCAGTCTTCC
TCTTCCCCCCAAAACCCAAGGACACCCTCATGATCTCCCGGACCCCTGAGGTCACATGCGTG
GTGGTGGACGTGAGCCACGAAGACCCTGAGGTCAAGTTCAACTGGTACGTGGACGGCGTGGA
GGTGCATAATGCCAAGACAAAGCCGCGGGAGGAGCAGTACAACAGCACGTACCGTGTGGTCA
GCGTCCTCACCGTCCTGCACCAGGACTGGCTGAATGGCAAGGAGTACAAGTGCAAGGTCTCC
AACAAAGCCCTCCCAGCCCCCATCGAGAAAACCATCTCCAAAGCCAAAGGGCAGCCCCGAGA
ACCACAGGTGTACACCCTGCCCCCATCCCGGGAAGAGATGACCAAGAACCAGGTCAGCCTGA
CCTGCCTGGTCAAAGGCTTCTATCCCAGCGACATCGCCGTGGAGTGGGAGAGCAATGGGCAG
CCGGAGAACAACTACAAGACCACGCCTCCCGTGCTGGACTCCGACGGCTCCTTCTTCCTCTA
CAGCAAGCTCACCGTGGACAAGAGCAGGTGGCAGCAGGGGAACGTCTTCTCATGCTCCGTGA
TGCATGAGGCTCTGCACAACCACTACACGCAGAAGAGCCTCTCCCTGTCTCCGGGTAAATGA
GTGCGACGGCCCTAGAGTCGACCTGCAGAAGCTTGGCCGCCAT

FIG. 5

Chuỗi nặng kháng CD79b của người khảm (chMA79b)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNY
NEIFKGKATFTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSVTVSSAST
KGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLY
SLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSV
FLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTY
RVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTK
NQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQG
NVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG. 6

Trình tự VL

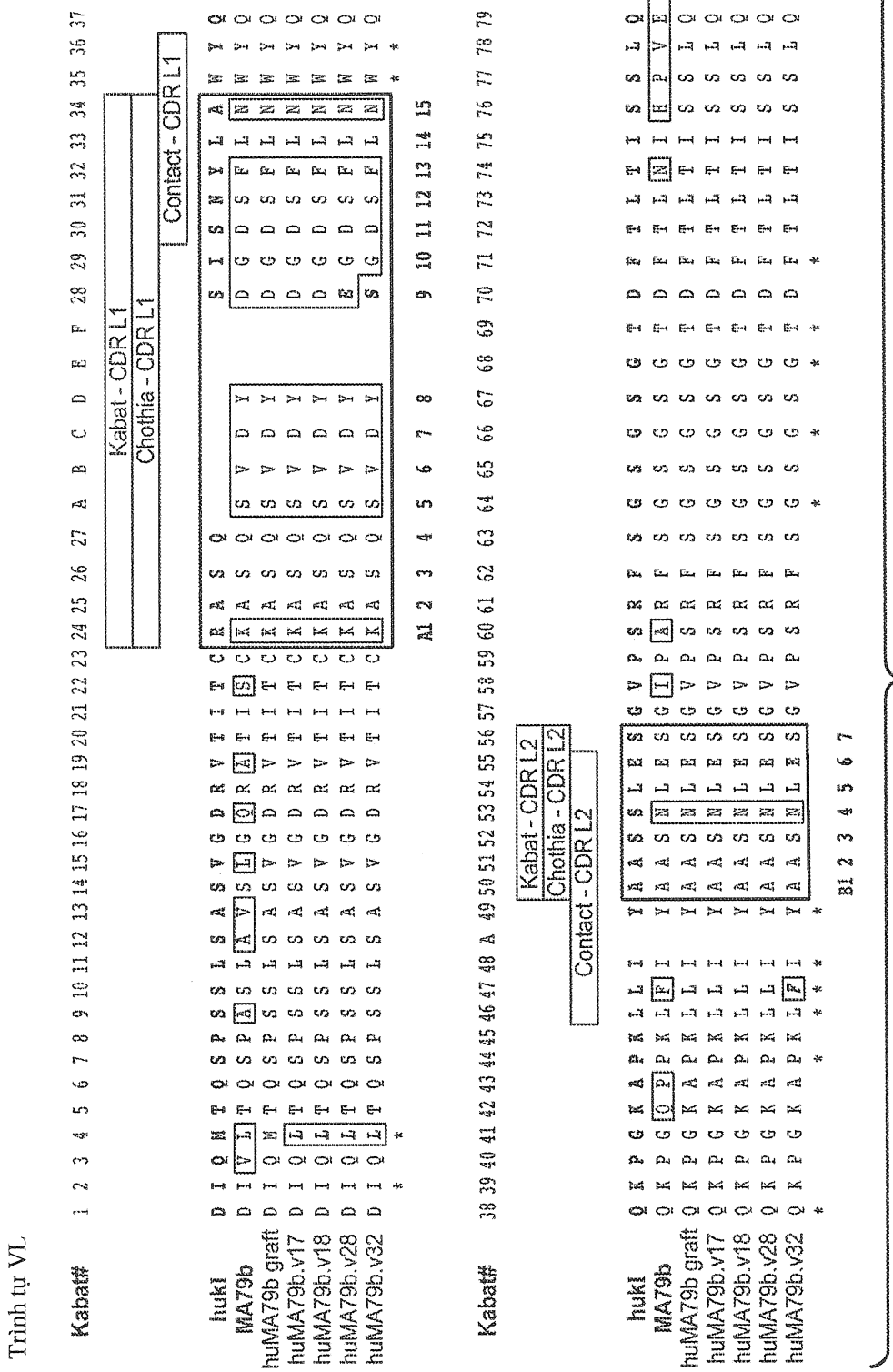


FIG. 7A

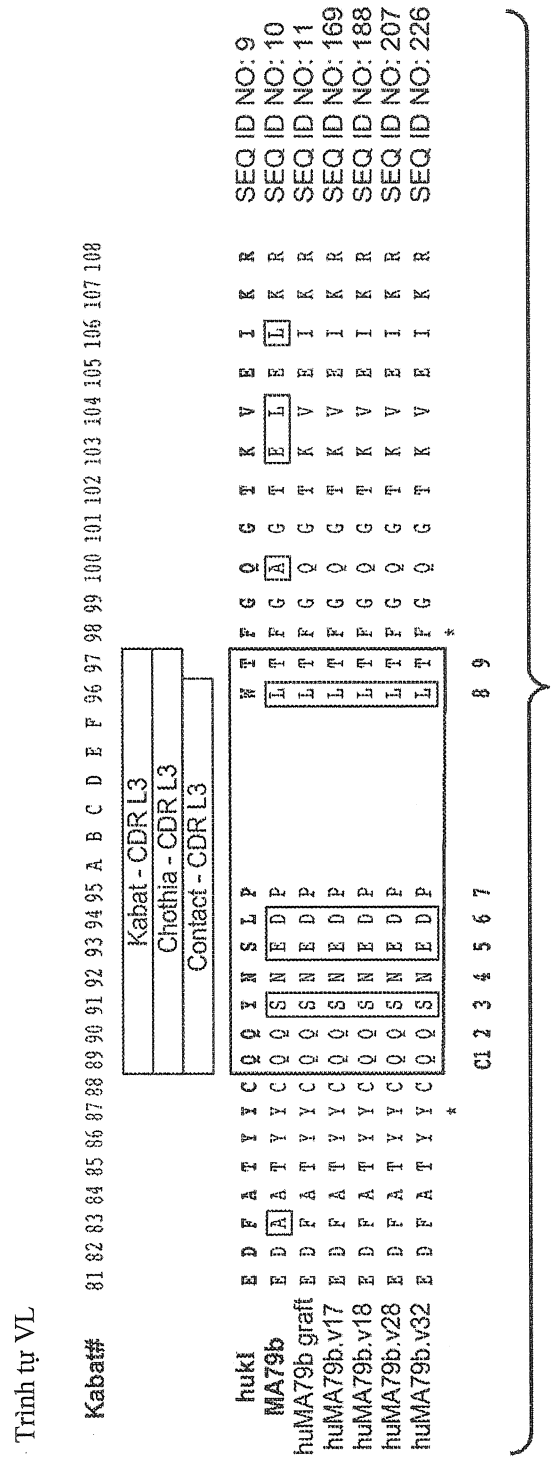

Trình tự VL
Kabat#
81 82 83 84 85 86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 A B C D E F 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107 108
Kabat - CDR L3
Chothia - CDR L3
Contact - CDR L3
hukI
MA79b
huMA79b graft
huMA79b.v17
huMA79b.v18
huMA79b.v28
huMA79b.v32
E D F A T Y Y C Q Q Y W S L P W T F G Q G T K V E I K R
E D A A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G A G T E L E L K R
E D F A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G Q G T K V E I K R
E D F A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G Q G T K V E I K R
E D F A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G Q G T K V E I K R
E D F A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G Q G T K V E I K R
E D F A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G Q G T K V E I K R
E D F A T Y Y C Q Q S N E D P L T F G Q G T K V E I K R
SEQ ID NO: 9
SEQ ID NO: 10
SEQ ID NO: 11
SEQ ID NO: 169
SEQ ID NO: 188
SEQ ID NO: 207
SEQ ID NO: 226
C1 2 3 4 5 6 7 8 9

FIG. 7B

, Trình tự VH

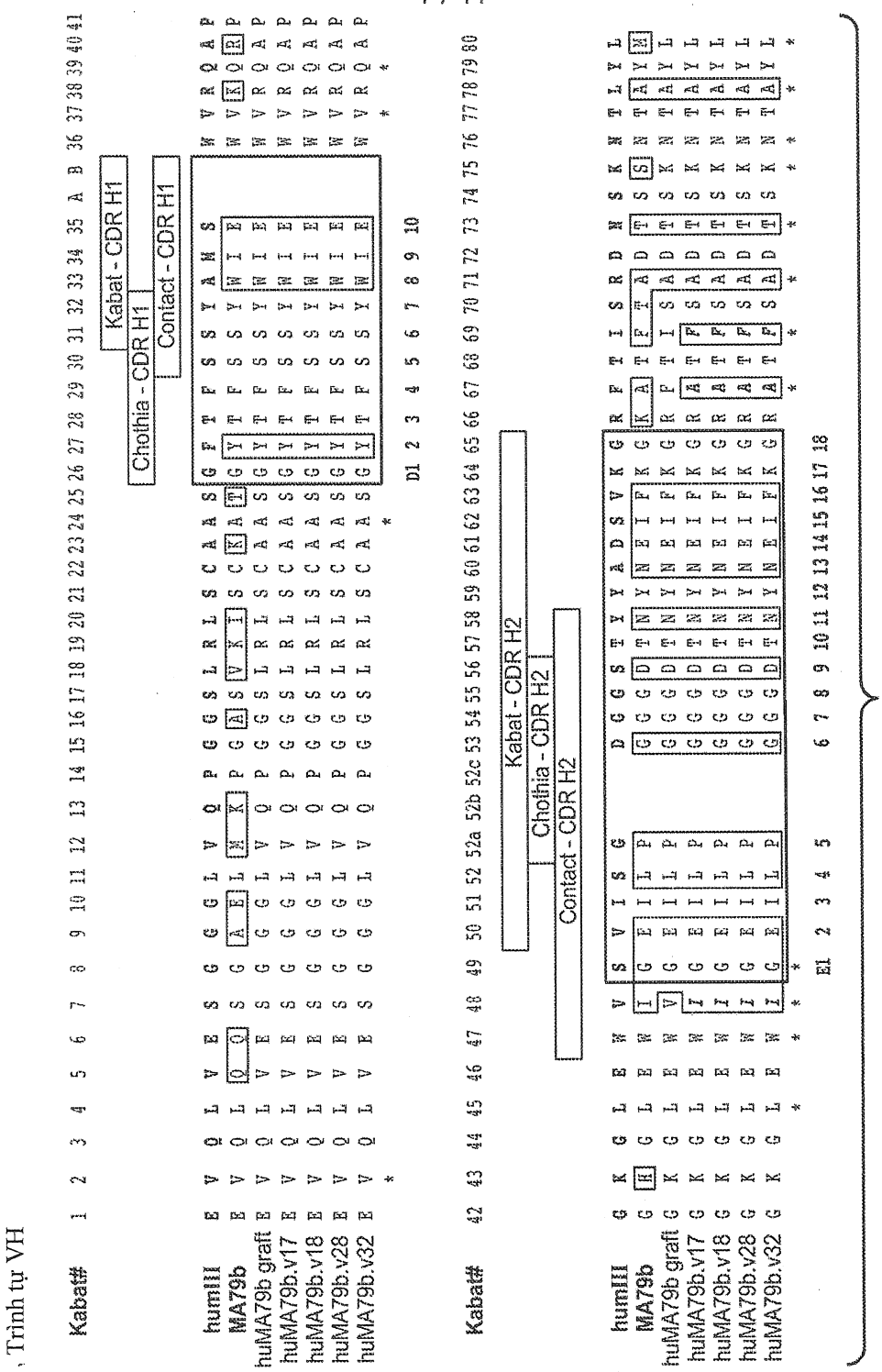


FIG. 8A

Trình tự VH

FIG. 8B

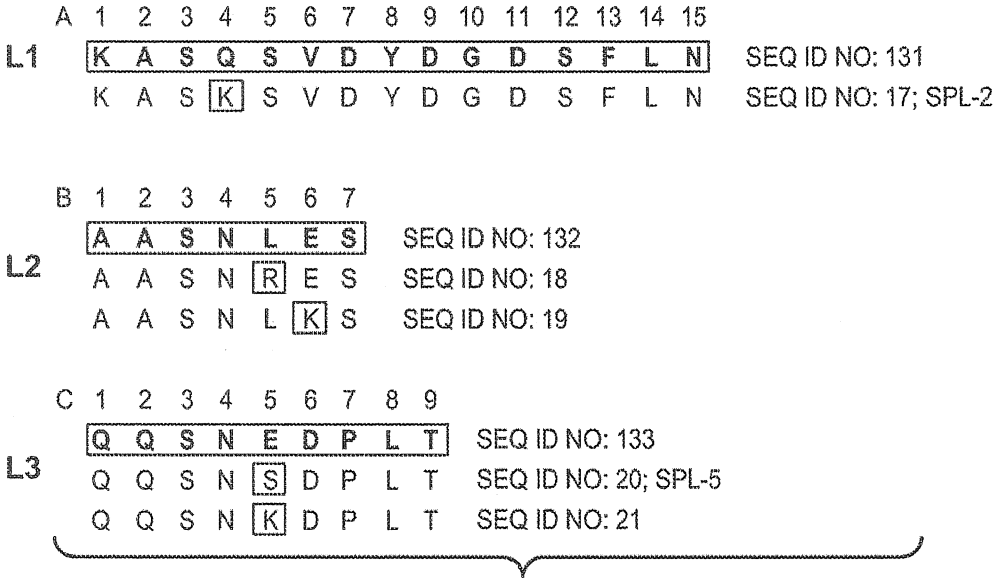


FIG. 9

	Biacore KD (nM)		
MA79b Variant IgG	Fab	IgG	Kháng thể được làm bất động
MA79b	200	2	hu CD79b.ecd-Fc
		4.7	hu CD79b.ecd
hu MA79b graft		261	hu CD79b.ecd
hu MA79b L2-2	44		hu CD79b.ecd-Fc
	39	43	hu CD79b.ecd
hu MA79b H3-10		29	hu CD79b.ecd
hu MA79b H1-6		42	hu CD79b.ecd
hu MA79b L2/H3		2	hu CD79b.ecd-Fc
		3	hu CD79b.ecd
		1	16mer peptide

FIG. 11

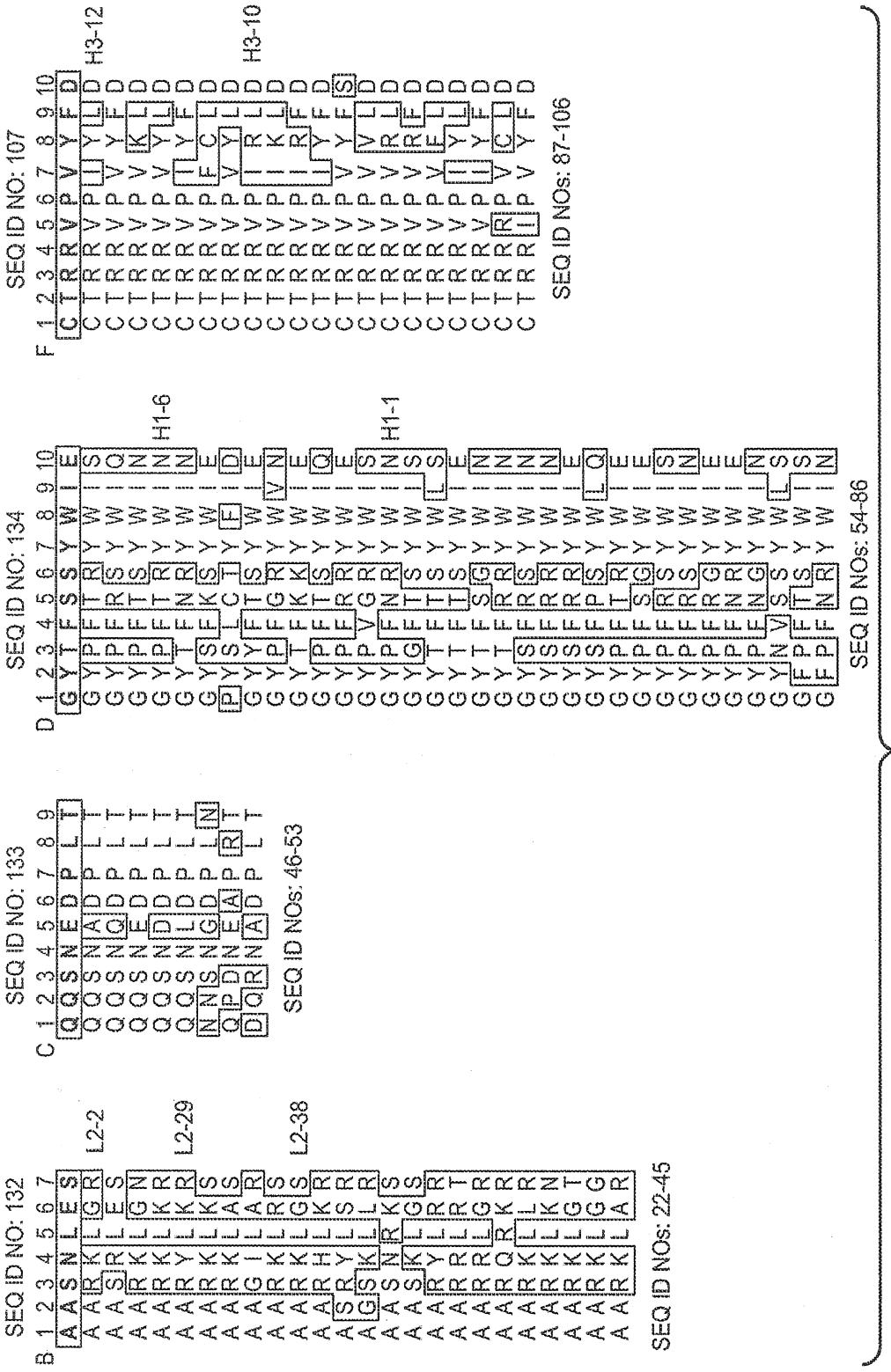

L2
SEQ ID NO: 132
L3
SEQ ID NO: 133
H1
SEQ ID NO: 134
H3
SEQ ID NO: 107
L2-2
L2-29
L2-38
H1-6
H1-1
H3-12
H3-10
SEQ ID NOs: 22-45
SEQ ID NOs: 46-53
SEQ ID NOs: 54-86
SEQ ID NOs: 87-106

FIG. 10

huMA79 FW Biến thể IgG	Có mặt gốc khung của chuột: VL 4 47	VH 48 67 69 71 73 75 78 80	Thay đổi đối với tính ổn định trong VL: 28 29 94 95	CDR-H3 seq	Lần gắn kết hoá trị hai $Kd_{biến\ thể}/Kd_{khảm}$
ghép huMA79		71 73 78		wt	56
Tất cả khung	4 47	48 67 69 71 73 75 78 80		wt	1
1		48 71 73 78		wt	9.4
2	47	71 73 78		wt	18
3		67 69 71 73 75 78 80		wt	5.5
4		69 71 73 75 78 80		wt	12
5		48 67 69 71 73 75 78 80		wt	3.5
6		48 67 71 73 78		wt	7.6
7		48 69 71 73 78		wt	3.5
8		48 67 69 71 73 78		wt	1.7
9		48 67 69 71 73 78 80		wt	1.8
10		48 67 69 71 73 75 78		wt	NA
11		48 67 69 71 73 75 78 80		H3-10	0.6
12		48 67 69 71 73 78		H3-10	0.5
13	47	48 69 71 73 78		wt	1.8
14	4	48 69 71 73 78		wt	1.1
15	4 47	48 69 71 73 78		wt	0.8
16	4	48 67 71 73 78		wt	1.6
17	4	48 67 69 71 73 78		wt	1.0
18	4	48 67 69 71 73 78		H3-10	0.4
19	4	48 67 69 71 73 78	S E	H3-10	NDB
20	4	48 67 69 71 73 78	S N	H3-10	NDB
21	4	48 67 69 71 73 78	E E	H3-10	NDB
22	4	48 67 69 71 73 78	E N	H3-10	NDB
23	4 47	48 67 69 71 73 78	S E	H3-10	25
24	4 47	48 67 69 71 73 78	S N	H3-10	NDB
25	4 47	48 67 69 71 73 78	E E	H3-10	NDB
26	4 47	48 67 69 71 73 78	E N	H3-10	NDB
27	4 47	48 67 69 71 73 78		H3-10	
28	4	48 67 69 71 73 78	E	H3-10	0.8
29		48 67 69 71 73 78	N	H3-10	rất yếu
30	4 47	48 67 69 71 73 78	A	H3-10	1.3
31	4 47	48 67 69 71 73 78	S	H3-10	1.0
32	4 47	48 67 69 71 73 78	S	H3-10	1.6
33	4 47	48 67 69 71 73 78	A	H3-10	rất yếu
34	4 47	48 67 69 71 73 78	E	H3-10	NDB

FIG. 12

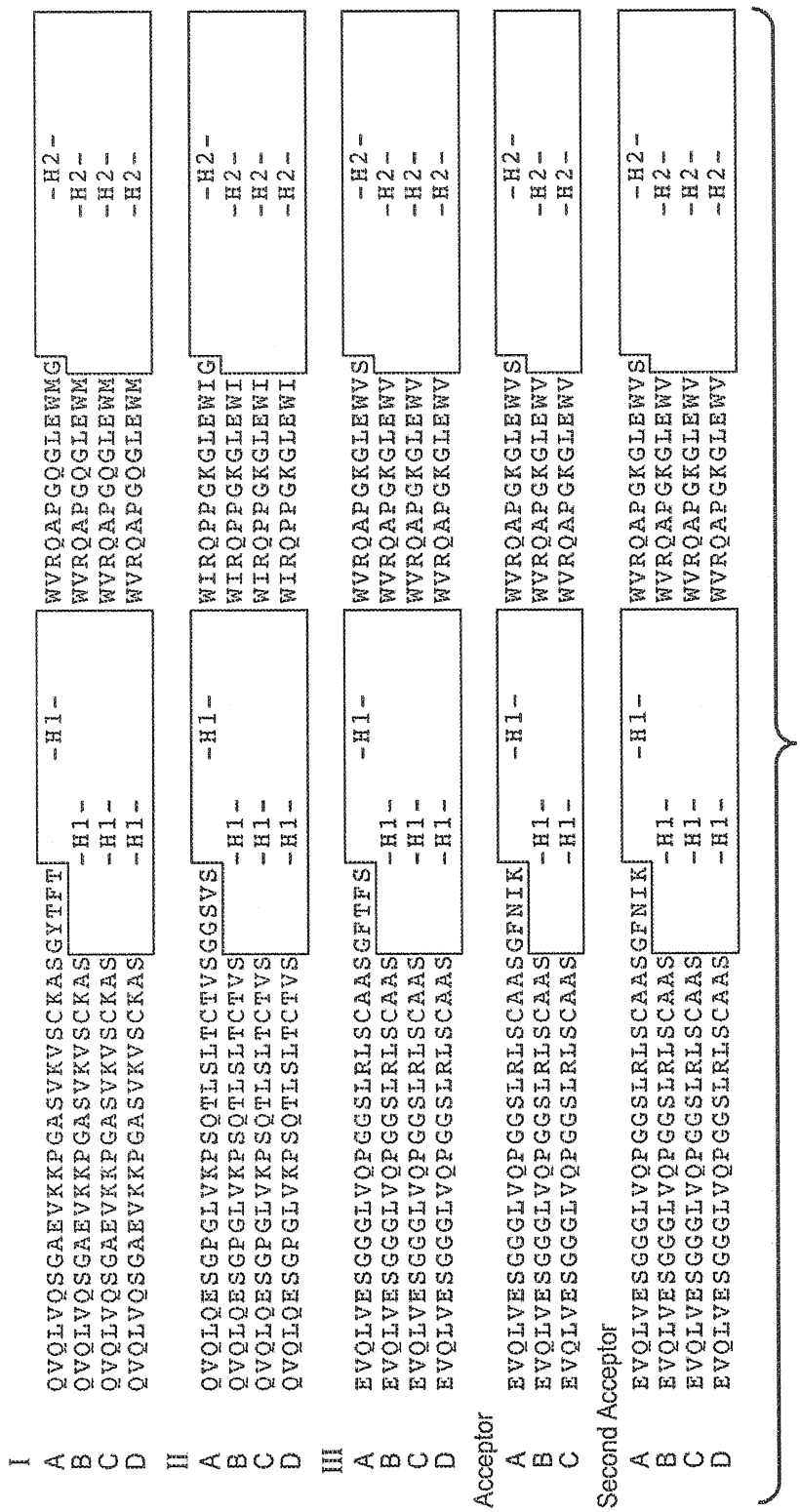

I
A QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKASGYTFT -H1- WVRQAPGQGLEWMG -H2-
B QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
C QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
D QVQLVQSGAEVKKPGASVKVSCKAS -H1- WVRQAPGQGLEWM -H2-
II
A QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVSGGSVS -H1- WIRQPPGKGLEWIG -H2-
B QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
C QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
D QVQLQESGPGLVKPSQTLSLTCTVS -H1- WIRQPPGKGLEWI -H2-
III
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFTFS -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
Acceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
Second Acceptor
A EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGFNIK -H1- WVRQAPGKGLEWVS -H2-
B EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
C EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-
D EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS -H1- WVRQAPGKGLEWV -H2-

FIG. 13A

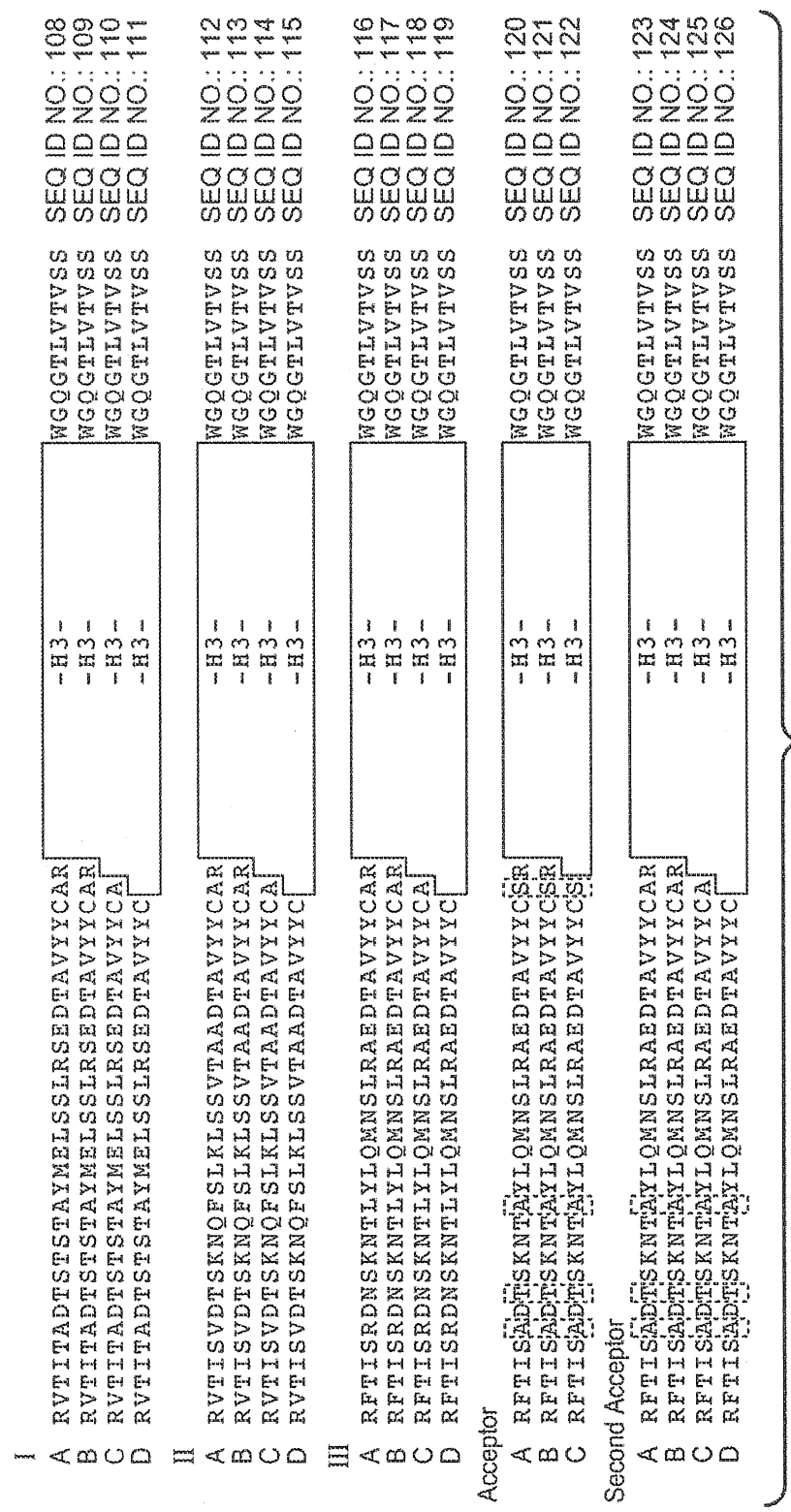

I
A RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 108
B RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 109
C RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 110
D RVTITADTSTSTAYMELSSLRSEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 111
II
A RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 112
B RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 113
C RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 114
D RVTISVDTSKNQFSLKLSSVTAADTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 115
III
A RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 116
B RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 117
C RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 118
D RFTISRDNSKNTLYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 119
Acceptor
A RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 120
B RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCSR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 121
C RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCS -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 122
Second Acceptor
A RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 123
B RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCAR -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 124
C RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCA -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 125
D RFTISADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC -H3- WGQGTLVTVSS SEQ ID NO.: 126

FIG. 13B

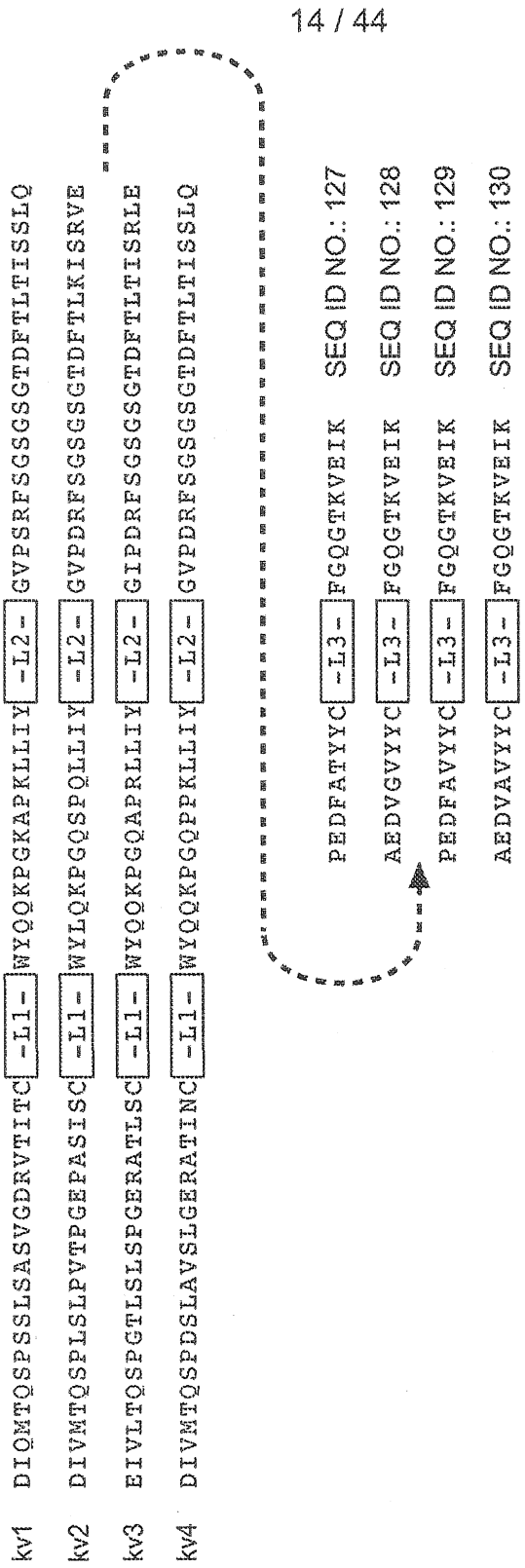

14 / 44
kv1 DIQMTQSPSSLSASVGDRVTITC -L1- WYQQKPGKAPKLLIY -L2- GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
kv2 DIVMTQSPLSLPVTPGEPASISC -L1- WYLQKPGQSPQLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVE
kv3 EIVLTQSPGTLSLSPGERATLSC -L1- WYQQKPGQAPRLLIY -L2- GIPDRFSGSGSGTDFTLTISRLE
kv4 DIVMTQSPDSLAVSLGERATINC -L1- WYQQKPGQPPKLLIY -L2- GVPDRFSGSGSGTDFTLTISSLQ
PEDFATYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 127
AEDVGVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 128
PEDFAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 129
AEDVAVYYC -L3- FGQGTKVEIK SEQ ID NO.: 130

FIG. 14

A. Chuỗi nhẹ huMA79b.v17

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 152)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 153)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 154)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 155)
HVR1-LC: KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 156)
HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 157)
HVR3-LC: QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 158)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 159)

Chuỗi nhẹ

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 303)

Miền biến đổi LC:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 169)

B. Chuỗi nặng huMA79b.v17

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 160)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 161)
FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 162)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 163)
HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 164)
HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 165)
HVR3-HC: TRRVPVYFDY (SEQ ID NO: 166)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
(SEQ ID NO:167)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 168)

Chuỗi nặng

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 304)

Miền biến đổi HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 170)

FIG. 15

A. Chuỗi nhẹ huMA79b.v18

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 171)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 172)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 173)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 174)
HVR1-LC: KASQSVDYDGDSFLN (SEQ ID NO: 175)
HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 176)
HVR3-LC: QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 177)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 178)

Chuỗi nhẹ

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 305)

Miền biến đổi LC:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 188)

B. Chuỗi nặng huMA79b.v18

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 179)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 180)
FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 181)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 182)
HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 183)
HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 184)
HVR3-HC: TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 185)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 186)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 187)

Chuỗi nặng:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 306)

Miền biến đổi HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 189)

FIG. 16

A. Chuỗi nhẹ huMA79b.v28

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 190)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLLIY (SEQ ID NO: 191)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 192)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 193)
HVR1-LC: KASQSVDYEGDSFLN (SEQ ID NO: 194)
HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 195)
HVR3-LC: QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 196)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK
DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC
(SEQ ID NO: 197)

Chuỗi nhẹ

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSG
SGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASV
VCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQG
LSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 307)

B. Chuỗi nặng huMA79b.v28

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 198)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 199)
FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 200)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 201)
HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 202)
HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 203)
HVR3-HC: TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 204)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA
VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT
(SEQ ID NO: 205)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH
NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP
QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL
YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 206)

Chuỗi nặng

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRA
TFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTS
GGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPE
VKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAK
GQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYS
KLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 308)

FIG. 17

A. Chuỗi nhẹ huMA79b.v32

FR1-LC: DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITC (SEQ ID NO: 209)
FR2-LC: WYQQKPGKAPKLFIY (SEQ ID NO: 210)
FR3-LC: GVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYC (SEQ ID NO: 211)
FR4-LC: FGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 212)
HVR1-LC: KASQSVDYSGDSFLN (SEQ ID NO: 213)
HVR2-LC: AASNLES (SEQ ID NO: 214)
HVR3-LC: QQSNEDPLT (SEQ ID NO: 215)
CL1: TVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSK DSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 216)

Chuỗi nhẹ

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYSGDSFLNWYQQKPGKAPKLFIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 309)

Miền biến đổi LC:

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYSGDSFLNWYQQKPGKAPKLFIYAASNLESGVPSRFSGS GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKR (SEQ ID NO: 226)

B. Chuỗi nặng huMA79b.v32

FR1-HC: EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAAS (SEQ ID NO: 217)
FR2-HC: WVRQAPGKGLEWI (SEQ ID NO: 218)
FR3-HC: RATFSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYC (SEQ ID NO: 219)
FR4-HC: WGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 220)
HVR1-HC: GYTFSSYWIE (SEQ ID NO: 221)
HVR2-HC: GEILPGGGDTNYNEIFKG (SEQ ID NO: 222)
HVR3-HC: TRRVPIRLDY (SEQ ID NO: 223)
CH1: ASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPA VLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHT (SEQ ID NO: 224)
Fc: CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVH NAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREP QVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFL YSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 225)

Chuỗi nặng

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 310)

Miền biến đổi HC:

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSS (SEQ ID NO: 227)

FIG. 18

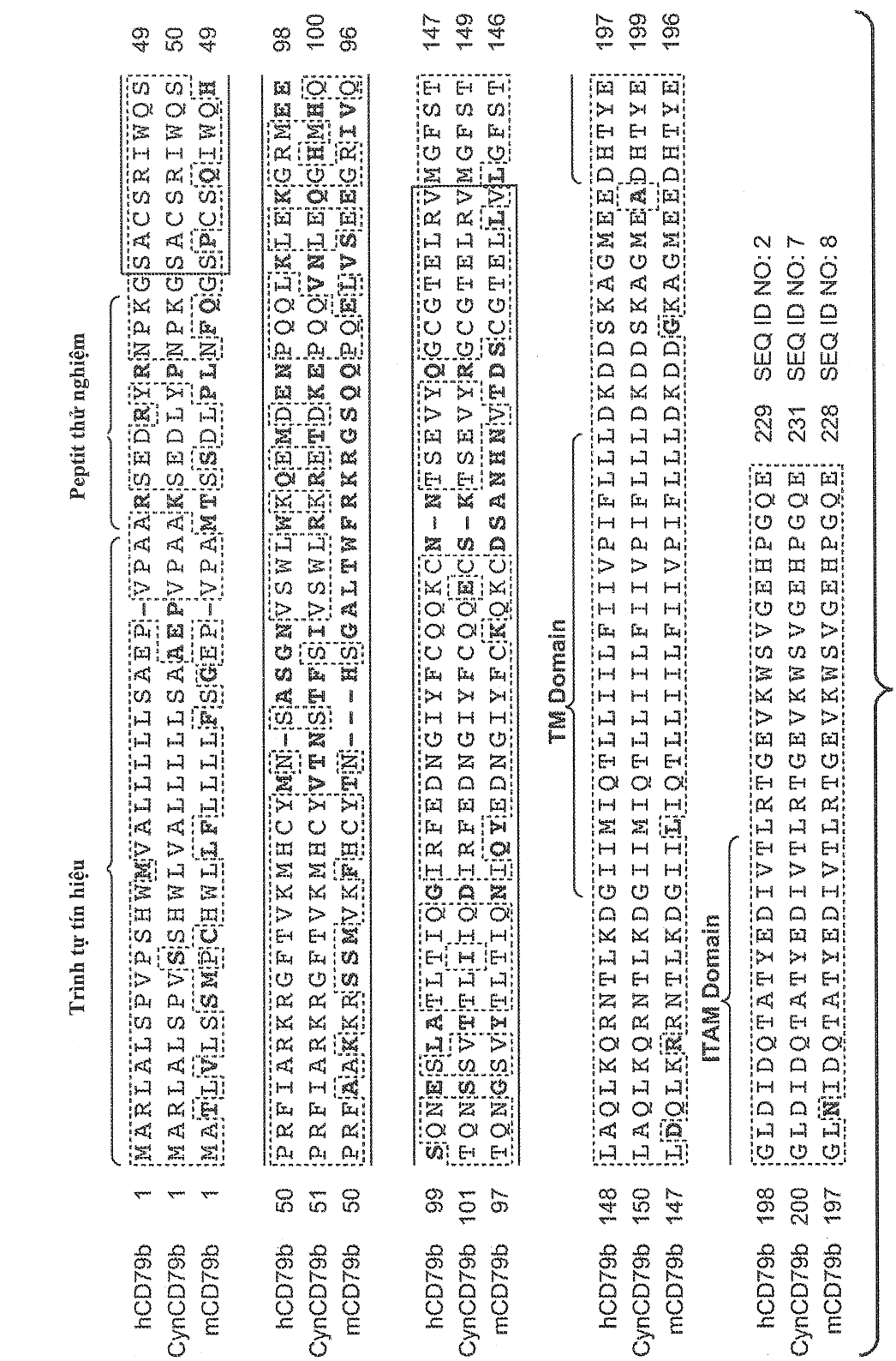

Trình tự tín hiệu
Peptit thử nghiệm
TM Domain
ITAM Domain
hCD79b 1 MARLALSPVPSHWMVALLLLSAEP-VPAARSEDRYRNPKGSACSRIWQS 49
CynCD79b 1 MARLALSPVSSHWLVALLLLSAEPVPAAKSEDLYPNPKGSACSRIWQS 50
mCD79b 1 MATLVLSSMPCHWLLFLLLLFSGEP-VPAMTSSDLPLNFQGSPCSQIWQH 49
hCD79b 50 PRFIARKRGFTVKMHCYMN-SASGNVSWLWKQEMDENPQQLKLEKGRMEE 98
CynCD79b 51 PRFIARKRGFTVKMHCYVTNSTFSIVSWLRKRETDKEPQQVNLEQGHMHQ 100
mCD79b 50 PRFAAKKRSSMVKFHCYTN---HSGALTWFRKRGSQQPQELVSEEGRIVQ 96
hCD79b 99 SQNESLATLTIQGIRFEDNGIYFCQQKCN-NTSEVYQGCGTELRVMGFST 147
CynCD79b 101 TQNSSVTTLIIQDIRFEDNGIYFCQQECS-KTSEVYRGCGTELRVMGFST 149
mCD79b 97 TQNGSVYTLTIQNTQYEDNGIYFCKQKCDSANHNVYTDSCGTELLVLGFST 146
hCD79b 148 LAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGMEEDHTYE 197
CynCD79b 150 LAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDSKAGMEADHTYE 199
mCD79b 147 LDQLKRNTLKDGIILIQTLLIILFIIVPIFLLLDKDDGKAGMEEDHTYE 196
hCD79b 198 GLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE 229 SEQ ID NO: 2
CynCD79b 200 GLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE 231 SEQ ID NO: 7
mCD79b 197 GLNIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE 228 SEQ ID NO: 8

FIG. 19

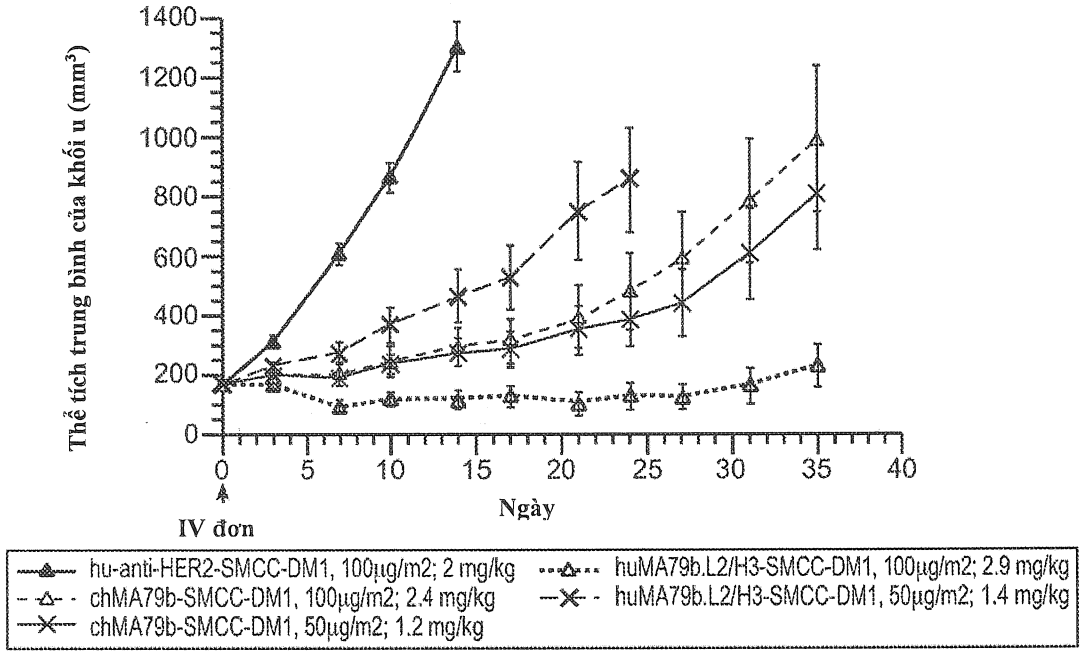

Thể tích trung bình của khối u (mm³)
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
5
10
15
20
25
30
35
40
Ngày
IV đơn
hu-anti-HER2-SMCC-DM1, 100µg/m2; 2 mg/kg
chMA79b-SMCC-DM1, 100µg/m2; 2.4 mg/kg
chMA79b-SMCC-DM1, 50µg/m2; 1.2 mg/kg
huMA79b.L2/H3-SMCC-DM1, 100µg/m2; 2.9 mg/kg
huMA79b.L2/H3-SMCC-DM1, 50µg/m2; 1.4 mg/kg

FIG. 20

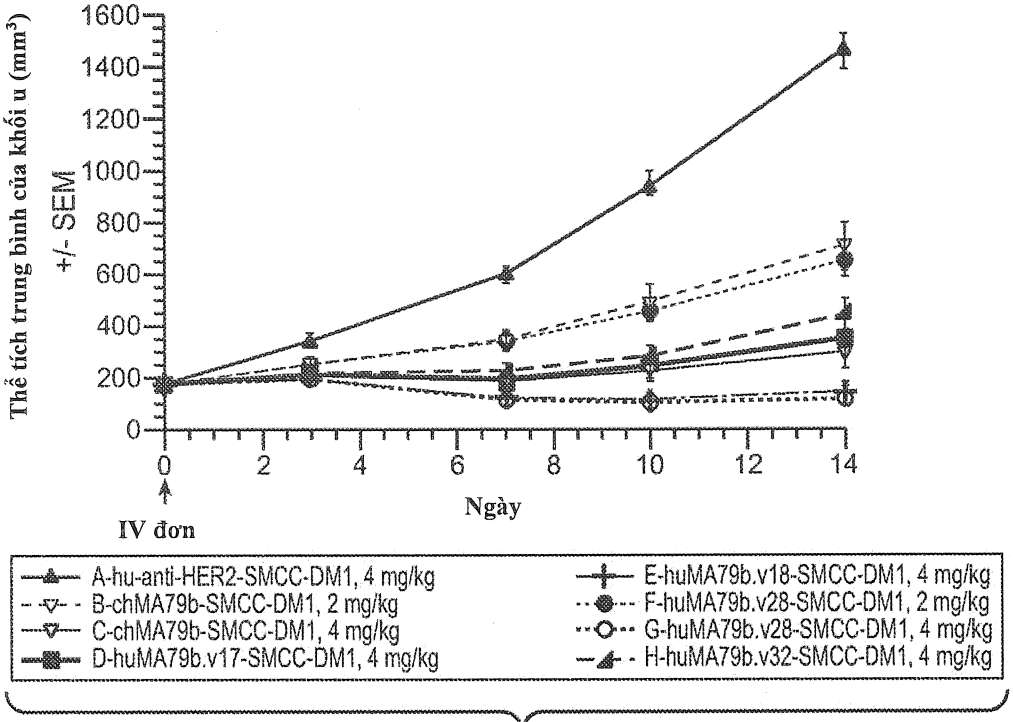


FIG. 21A

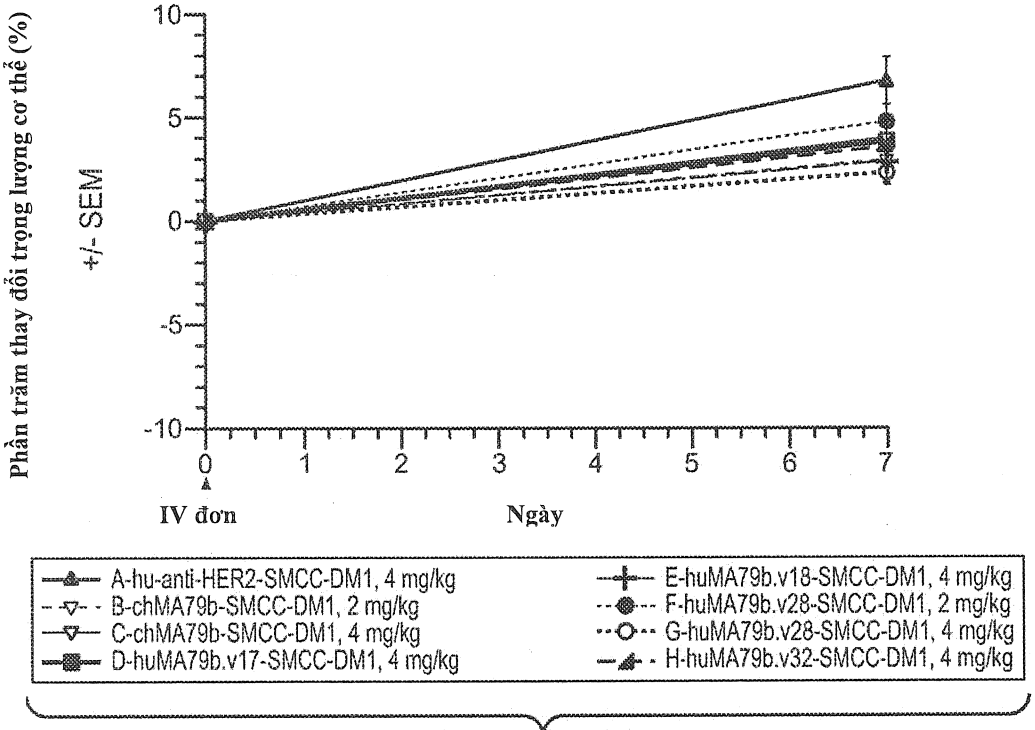


FIG. 21B

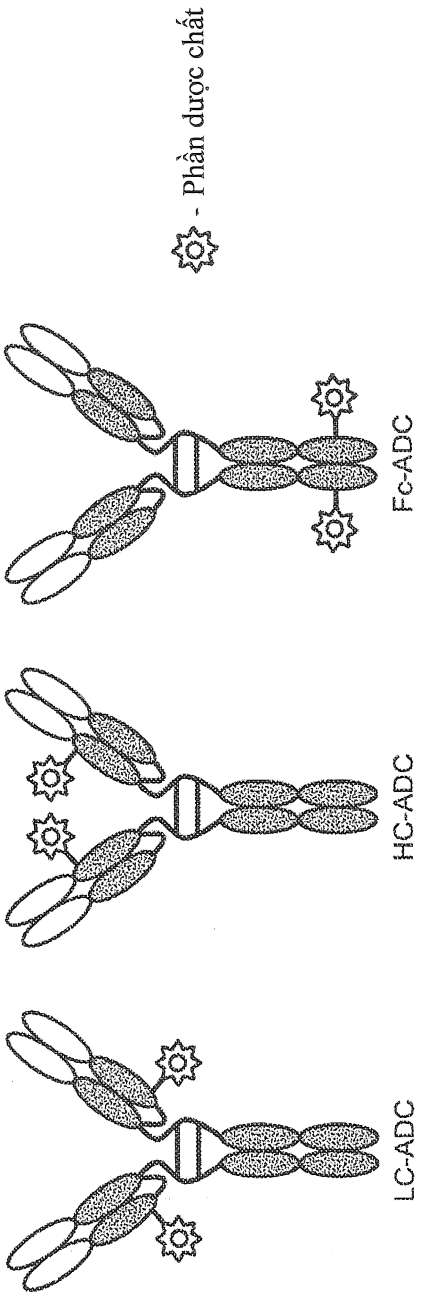

- Phần dược chất
LC-ADC
HC-ADC
Fc-ADC

FIG. 22

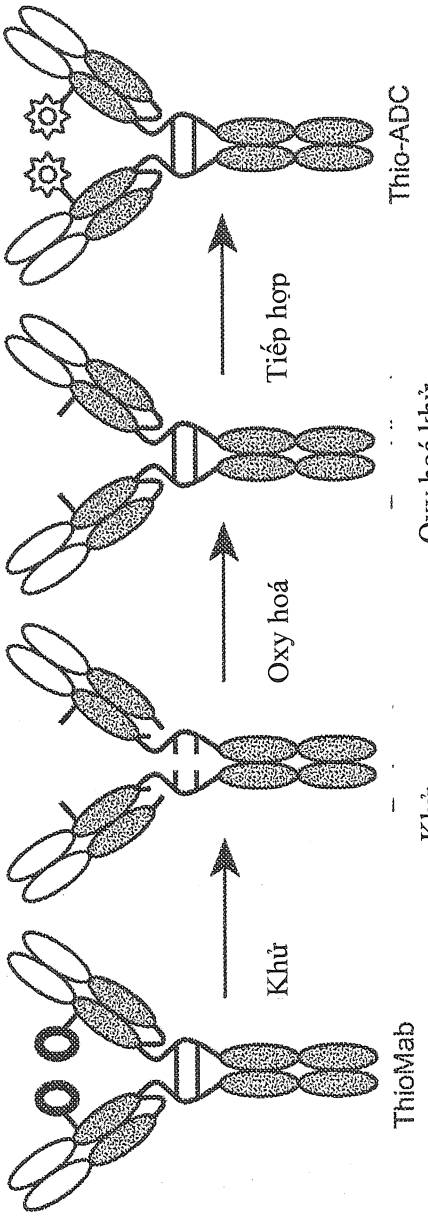

ThioMab
Khử
Oxy hoá
Oxy hoá khử
Tiếp hợp
Thio-ADC

FIG. 23

Chuỗi nặng ThioMAb sinh xystein kháng CD79b A118C huMA79b.v17

A. Trình tự chuỗi nhẹ
Thio-huMA79b.v17-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 229)

B. Trình tự chuỗi nặng
Thio-huMA79b.v17-HC-A118C (HC)

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRATFSAD
TSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLV
KDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDKKVEPKS
CDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPR
EEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSL
TCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 228)

FIG. 24

Chuỗi nặng ThioMAb sinh xystein kháng CD79b A118C huMA79b.v18

A. Trình tự chuỗi nhẹ
Thio-huMA79b.v18-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 231)

B. Trình tự chuỗi nặng
Thio-huMA79b.v18-HC-A118C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 230)

FIG. 25

Chuỗi nặng ThioMAb sinh xystein kháng CD79b A118C huMA79b.v28

A. Trình tự chuỗi nhẹ
Thio-huMA79b.v28-HC-A118C (LC)

DIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCKASQSVDYEGDSFLNWYQQKPGKAPKLLIYAASNLESGVPSRFSGS
GSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQSNEDPLTFGQGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 233)

B. Trình tự chuỗi nặng
Thio-huMA79b.v28-HC-A118C

EVQLVESGGGLVQPGGSLRLSCAASGYTFSSYWIEWVRQAPGKGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGRAT
FSADTSKNTAYLQMNSLRAEDTAVYYCTRRVPIRLDYWGQGTLVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 232)

FIG. 26

Chuỗi nhẹ ThioMAb sinh xystein kháng CD79b V205C chMA79b

A. Trình tự chuỗi nhẹ
Thio-chMA79b-LC-V205C (LC)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGQPPKLFIYAASNLESGIPARFSGS
GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 235)

B. Trình tự chuỗi nặng
Thio-chMA79b-LC-V205C (HC)

EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 234)

FIG. 27

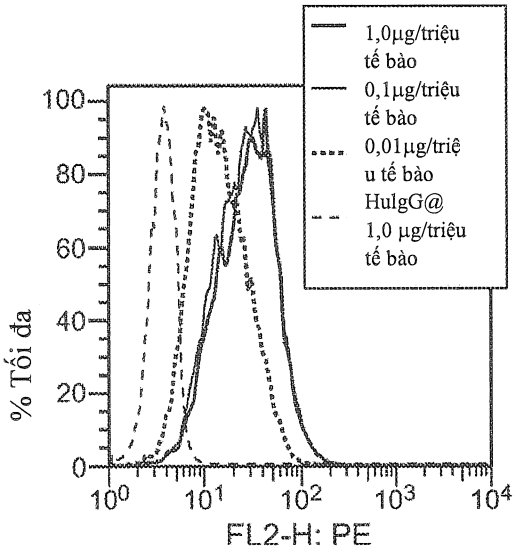
Chuỗi nặng ThioMAb sinh xystein kháng CD79b A118C chMA79b
A. Trình tự chuỗi nhẹ
Thio chMA79b-HC-A118C (LC)

DIVLTQSPASLAVSLGQRATISCKASQSVDYDGDSFLNWYQQKPGQPPKLFIYAASNLESGIPARFSGS
GSGTDFTLNIHPVEEEDAATYYCQQSNEDPLTFGAGTELELKRTVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTASVVC
LLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKVYACEVTHQGLSS
PVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 237)

B. Trình tự chuỗi nặng
Thio chMA79b-HC-A118C (HC)

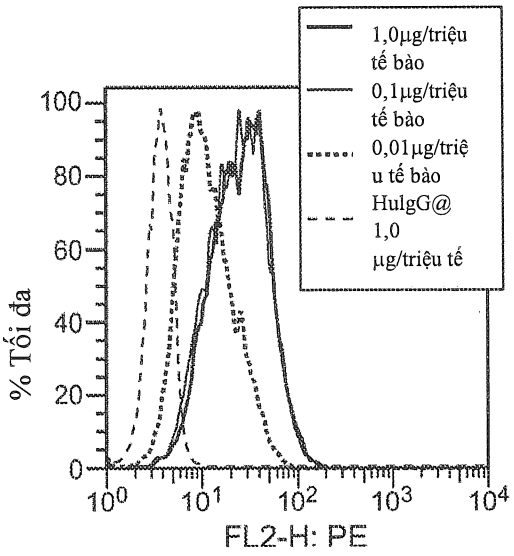
EVQLQQSGAELMKPGASVKISCKATGYTFSSYWIEWVKQRPGHGLEWIGEILPGGGDTNYNEIFKGKAT
FTADTSSNTAYMQLSSLTSEDSAVYYCTRRVPVYFDYWGQGTSVTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKSTSGG
TAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNHKPS
NTKVDKKVEPKSCDKTHT*CPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVDVSHEDPEVKFN*
WYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPAPIEKTISKAKGQPRE
PQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFFLYSKLTVDK
SRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 236)

FIG. 28



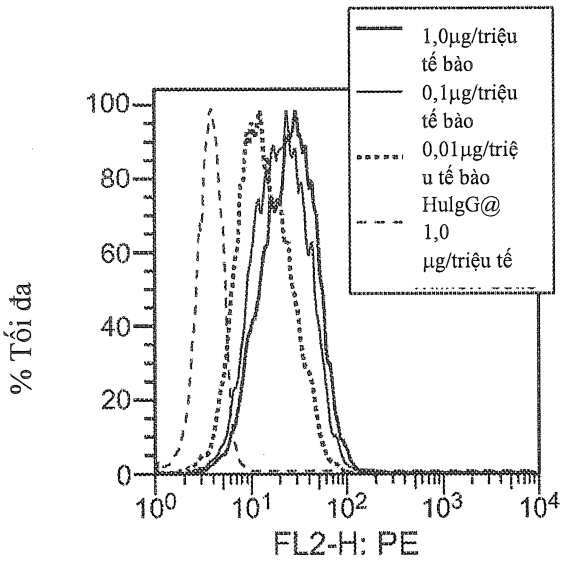
Gắn kết của Thio chMA79b-LC(V205C)-MC-MMAF với BJAB-lucs

FIG. 29A



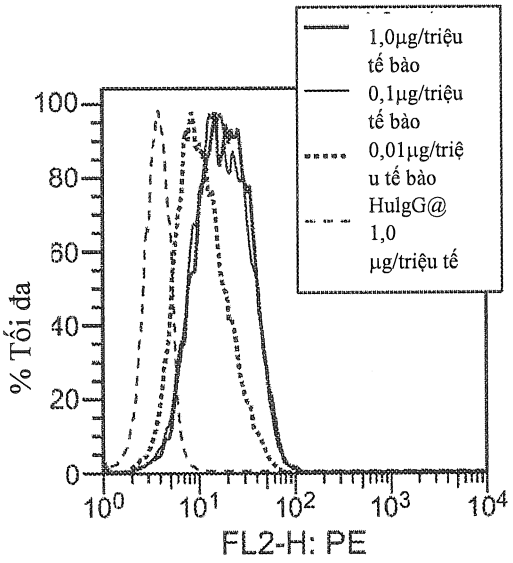
Gắn kết của Thio chMA79b-HC(A118C)-MC-MMAF với BJAB-lucs

FIG. 29B



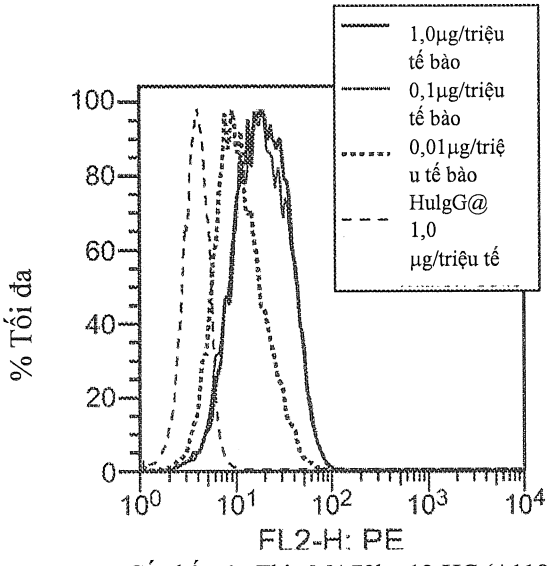
Gắn kết của Thio MA79b.v18-HC (A118C) trần với BJAB-lucs

FIG. 30A



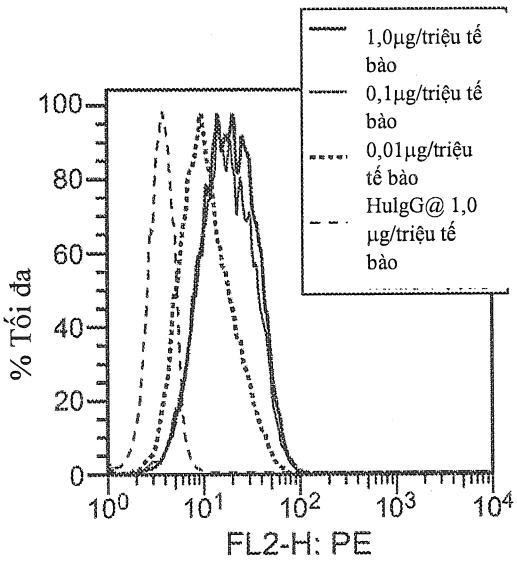
Gắn kết của Thio MA79b.v18-HC (A118C)-MC-MMAF với BJAB-lucs

FIG. 30B



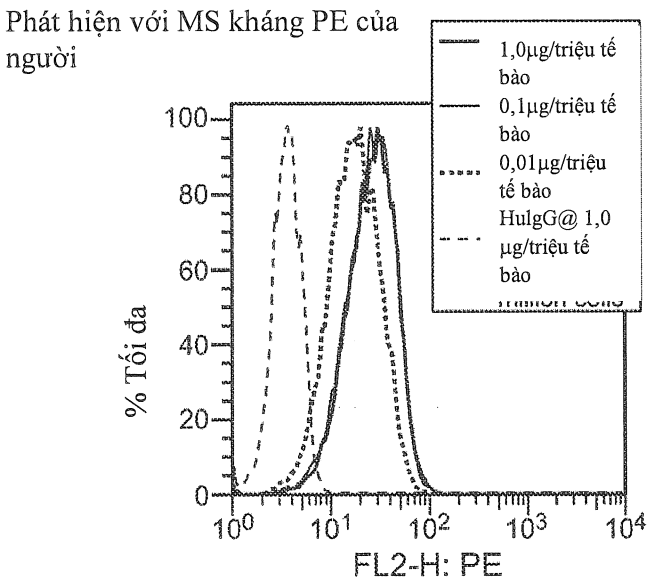
Gắn kết của Thio MA79b.v18-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE với BJAB-lucs

FIG. 30C



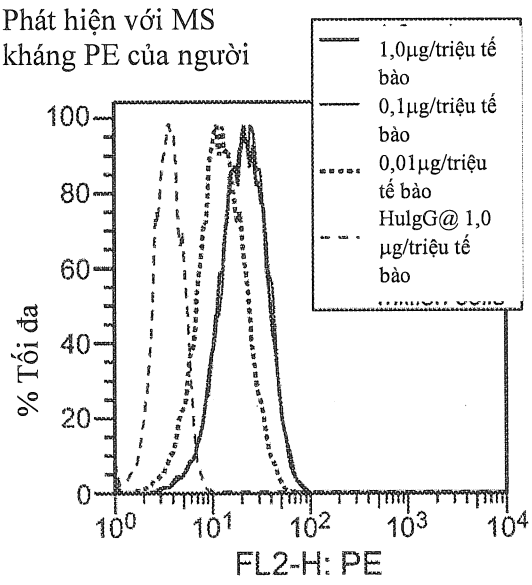
Gắn kết của Thio MA79b.v18-HC (A118C)-BMPEO-DM1 với BJAB-lucs

FIG. 30D



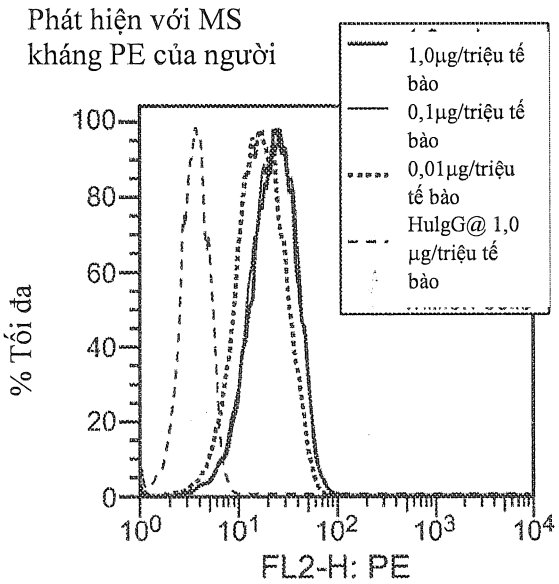
Gắn kết với Thio MA79b.v28-HC (A118C) với BJAB-lucs

FIG. 31A



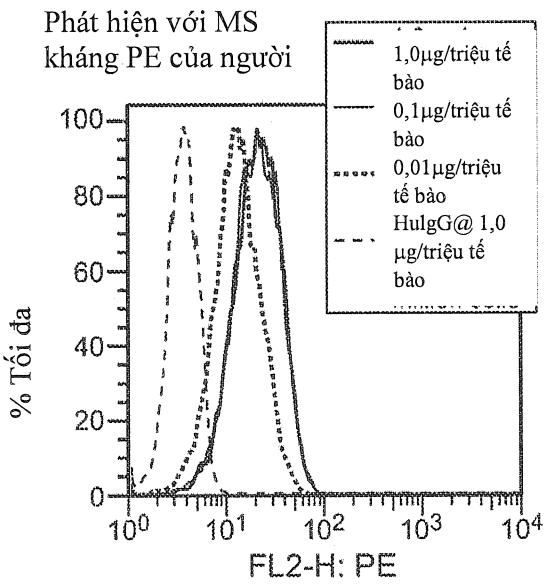
Gắn kết với Thio MA79b.v28-HC (A118C)-MCvcPAB-MMAE với BJAB-lucs

FIG. 31B



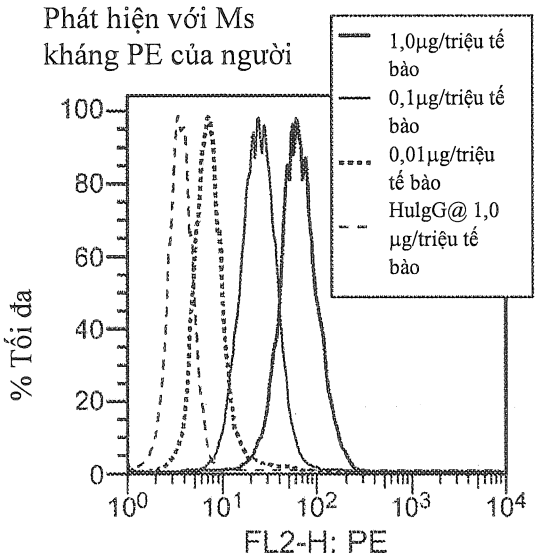
Gắn kết của Thio MA79b.v28-HC (A118C)-BMPEO-DM1 với BJAB-lucs

FIG. 31C



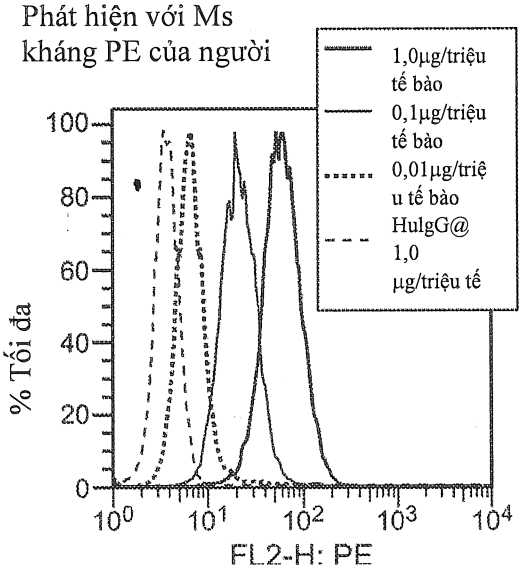
Gắn của Thio MA79b.v28-HC (A118C)-MC-MMAF với BJAB-lucs

FIG. 31D



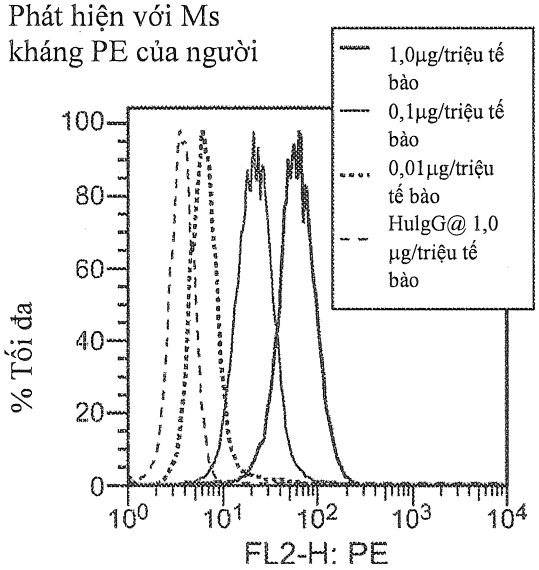
Gắn kết của Thio trần kháng xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C) với các tế bào BJAB-xynoCD79b

FIG. 32A



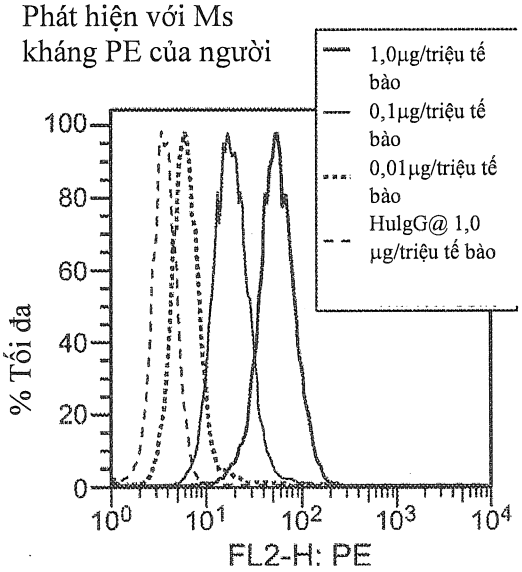
Gắn kết của Thio kháng xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE với tế bào BJAB-xynoCD79b

FIG. 32B



Gắn kết của Thio kháng xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1 với tế bào BJAB-xynoCD79b

FIG. 32C



Gắn kết của Thio kháng xynoCD79b (ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF với các tế bào BJAB-xynoCD79b

FIG. 32D

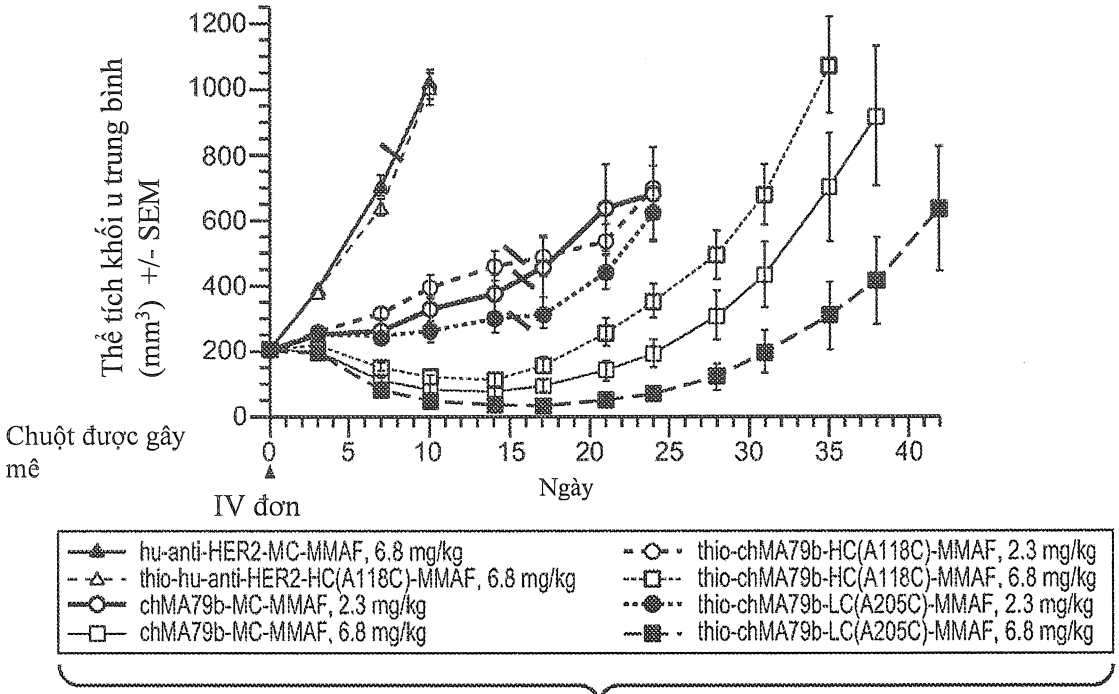


FIG. 33A

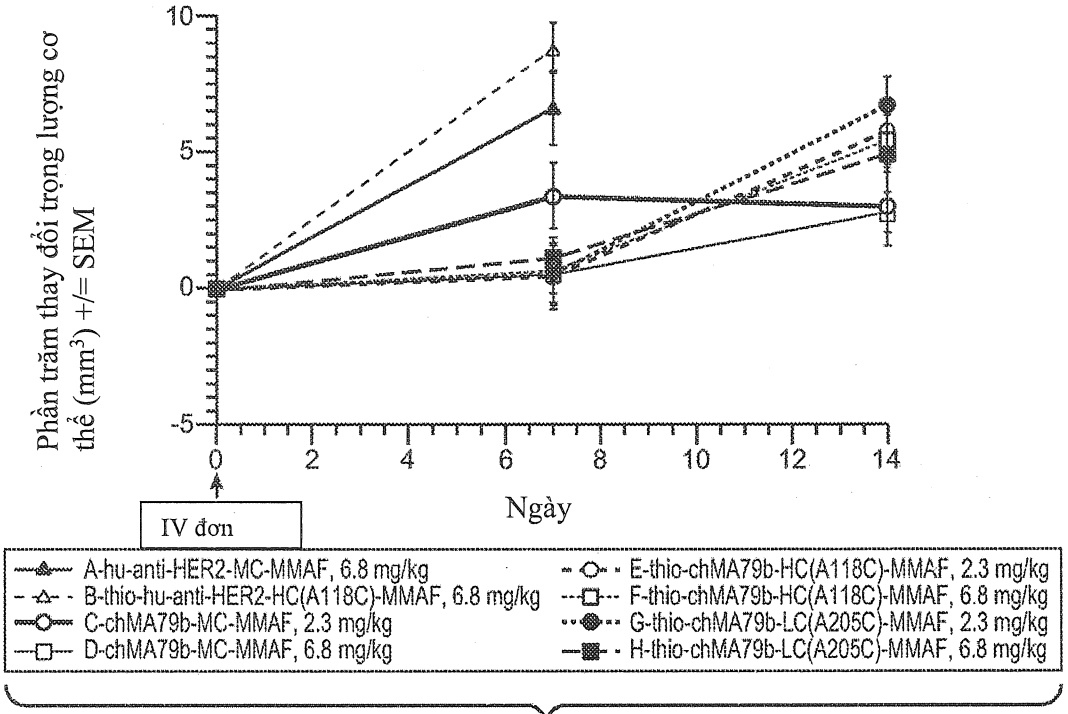


FIG. 33B

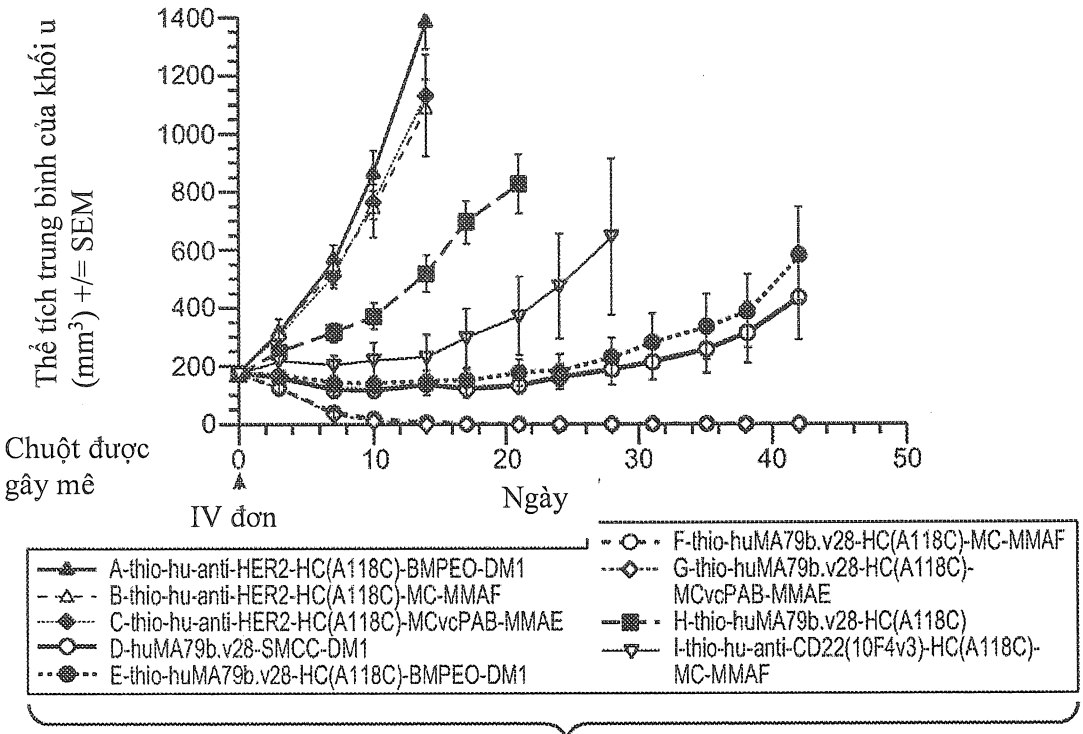


FIG. 34A

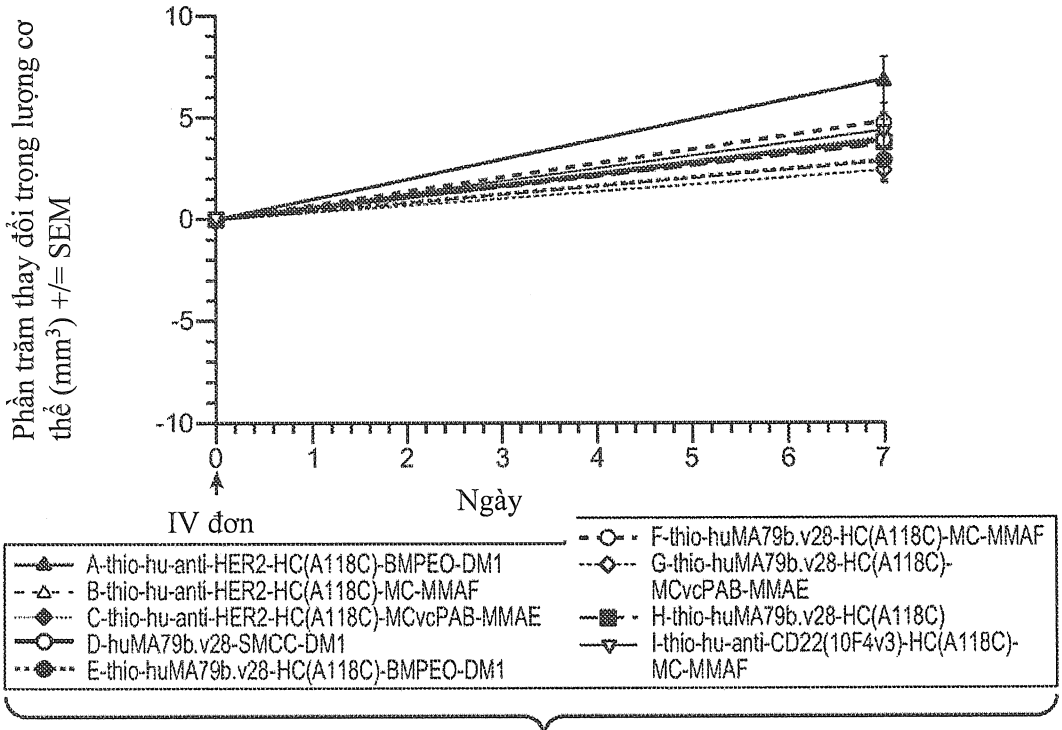


FIG. 34B

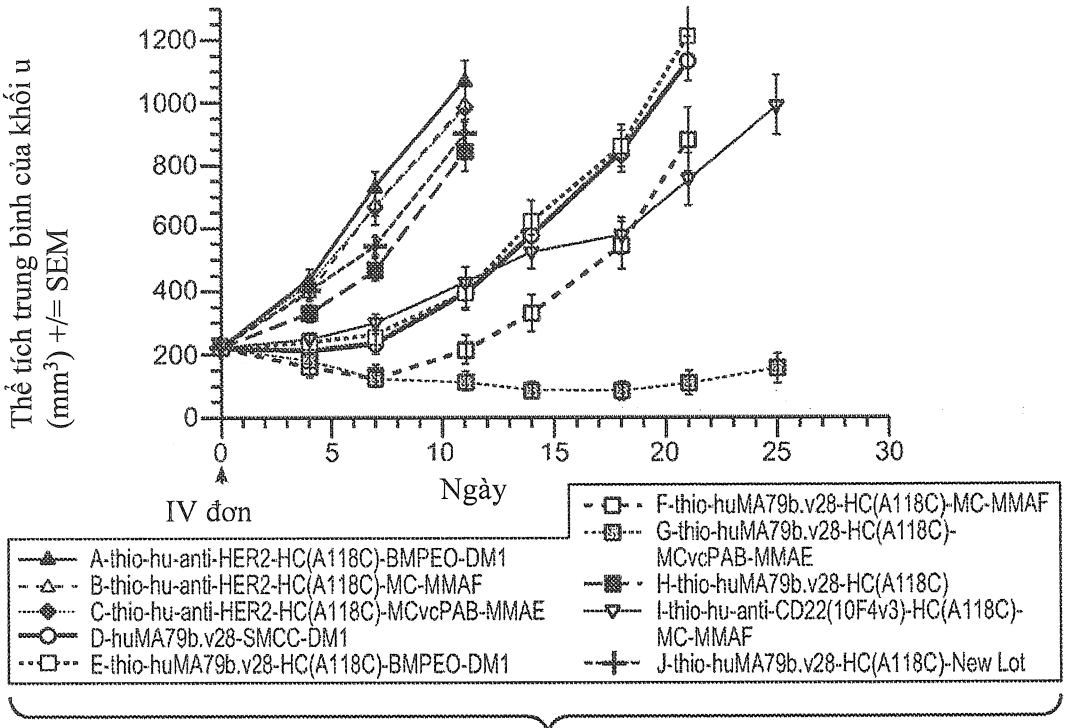


FIG. 35A

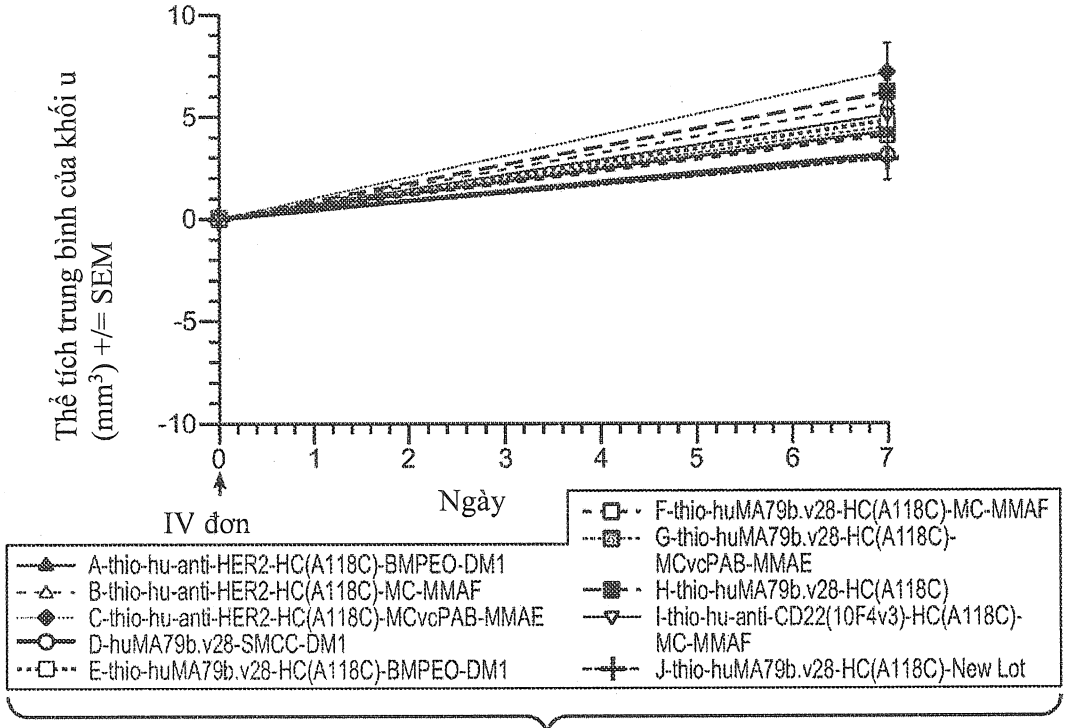


FIG. 35B

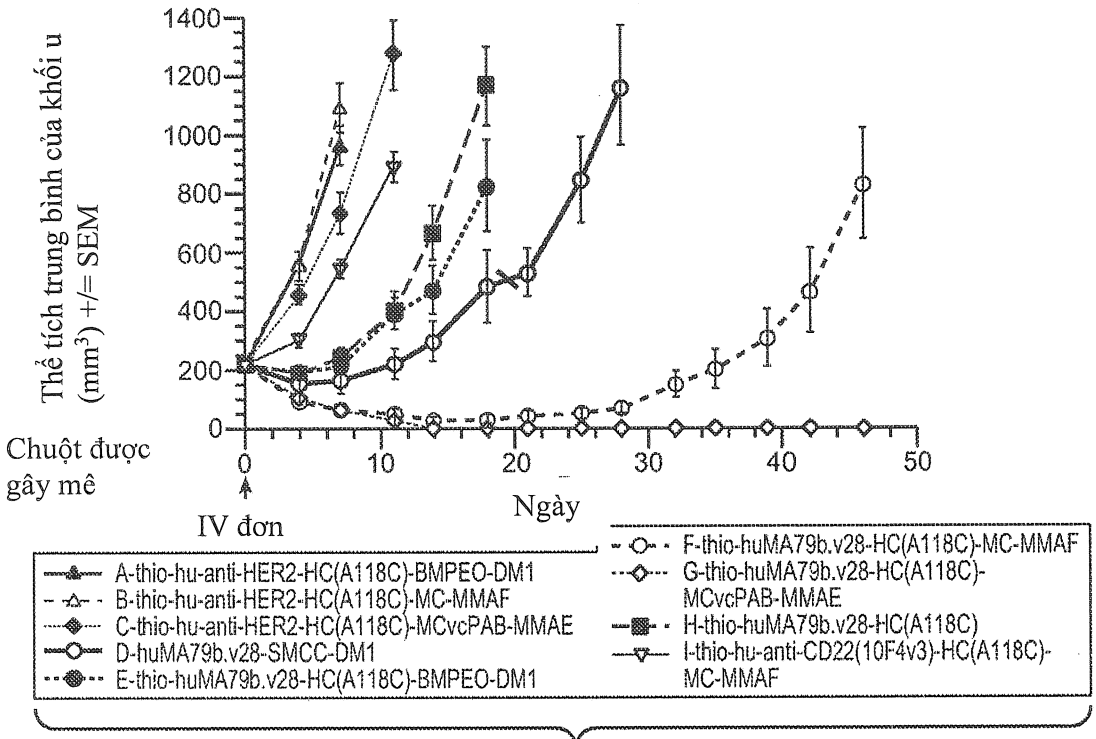

Thể tích trung bình của khối u (mm³) +/= SEM
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Ngày
Chuột được gây mê
IV đơn
A-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1
B-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF
C-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE
D-huMA79b.v28-SMCC-DM1
E-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1
F-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF
G-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE
H-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)
I-thio-hu-anti-CD22(10F4v3)-HC(A118C)-MC-MMAF

FIG. 36

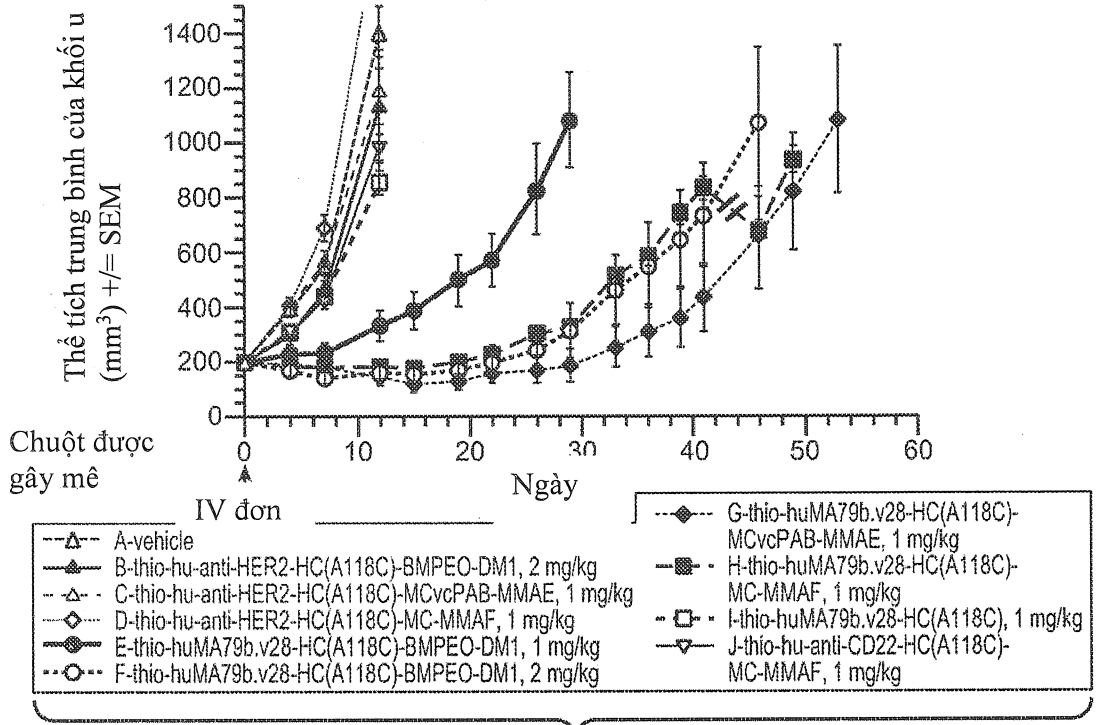

Thể tích trung bình của khối u (mm³) +/= SEM
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
60
Ngày
Chuột được gây mê
IV đơn
A-vehicle
B-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 2 mg/kg
C-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 1 mg/kg
D-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, 1 mg/kg
E-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 1 mg/kg
F-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 2 mg/kg
G-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 1 mg/kg
H-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, 1 mg/kg
I-thio-huMA79b.v28-HC(A118C), 1 mg/kg
J-thio-hu-anti-CD22-HC(A118C)-MC-MMAF, 1 mg/kg

FIG. 37

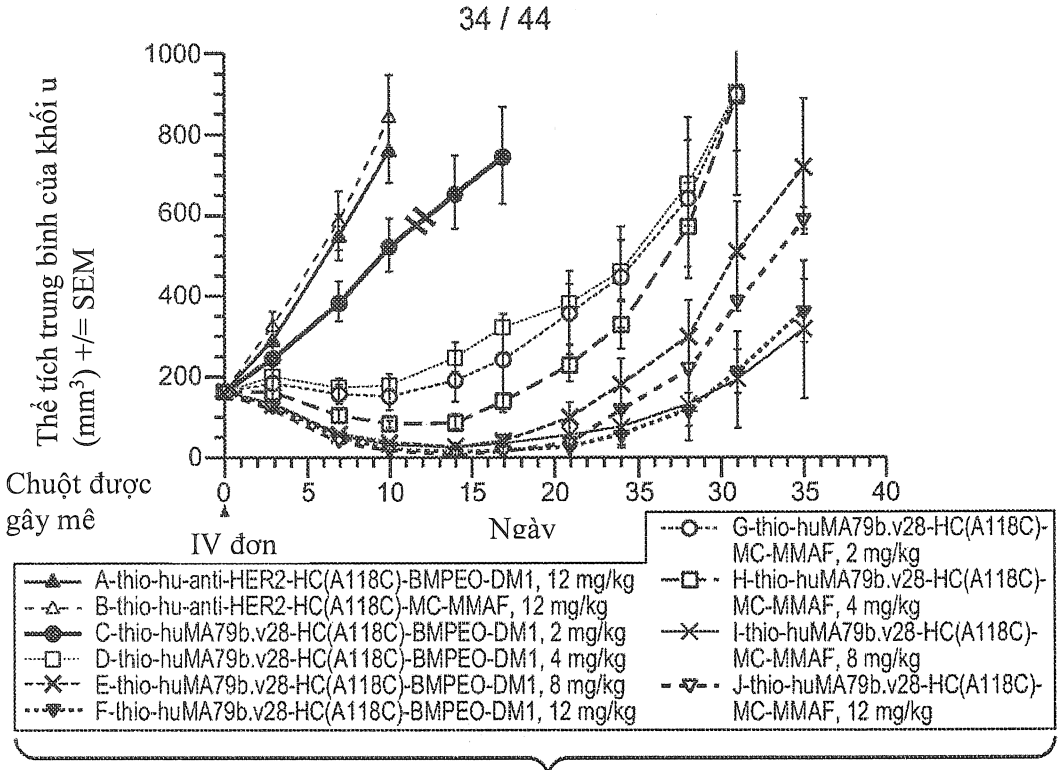


FIG. 38A

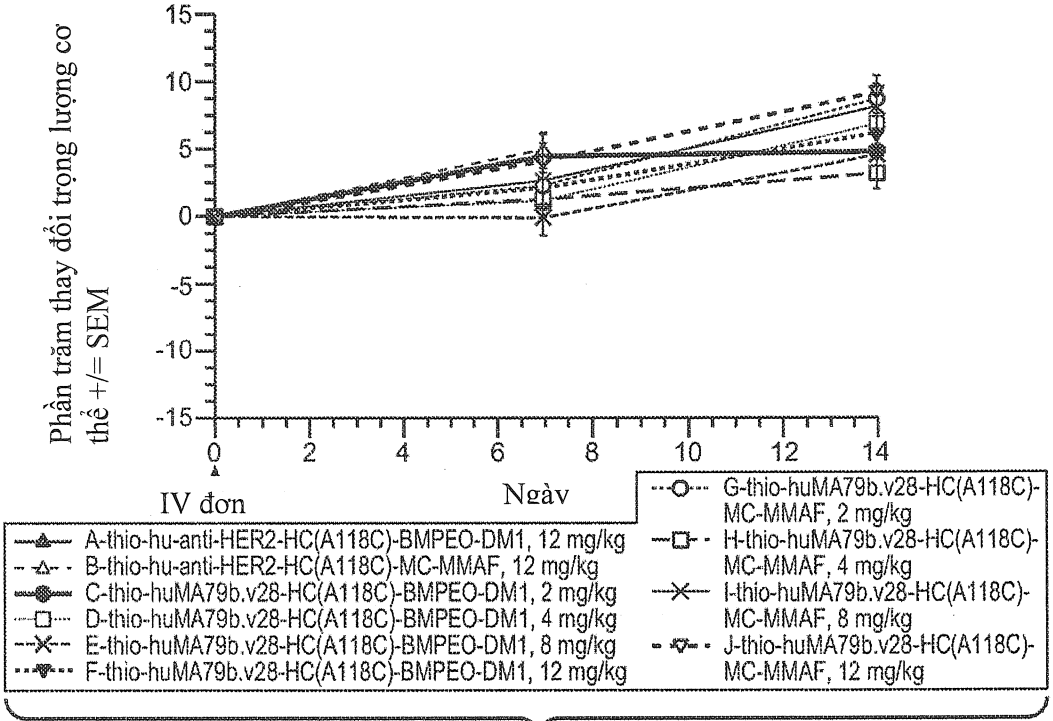


FIG. 38B

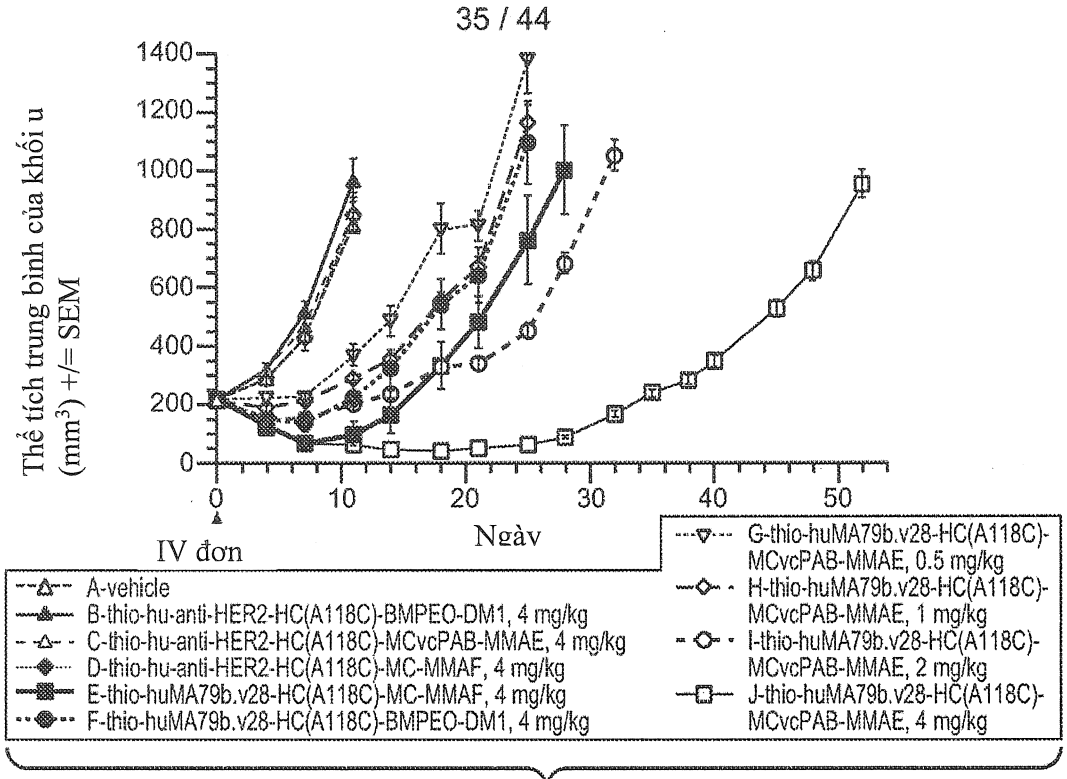

Thể tích trung bình của khối u
(mm3) +/= SEM
1400
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
IV đơn
Ngày
A-vehicle
B-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 4 mg/kg
C-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 4 mg/kg
D-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, 4 mg/kg
E-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, 4 mg/kg
F-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 4 mg/kg
G-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 0.5 mg/kg
H-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 1 mg/kg
I-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 2 mg/kg
J-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 4 mg/kg

FIG. 39

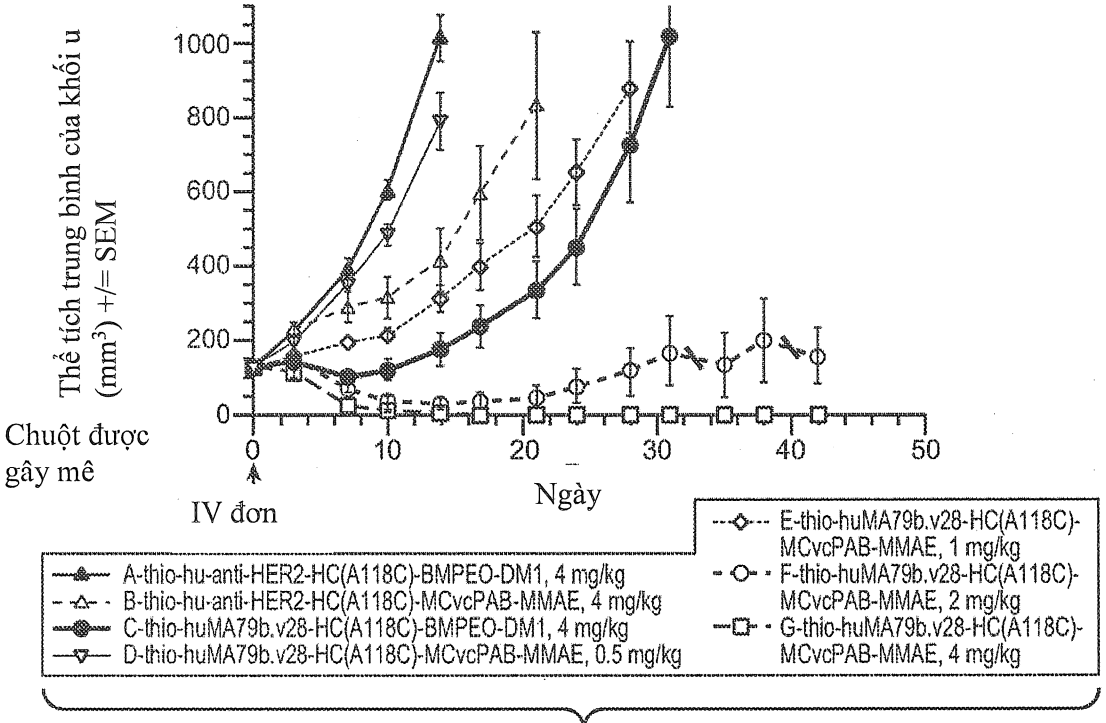

Thể tích trung bình của khối u
(mm3) +/= SEM
1000
800
600
400
200
0
Chuột được gây mê
0
10
20
30
40
50
IV đơn
Ngày
A-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 4 mg/kg
B-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 4 mg/kg
C-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 4 mg/kg
D-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 0.5 mg/kg
E-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 1 mg/kg
F-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 2 mg/kg
G-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 4 mg/kg

FIG. 40

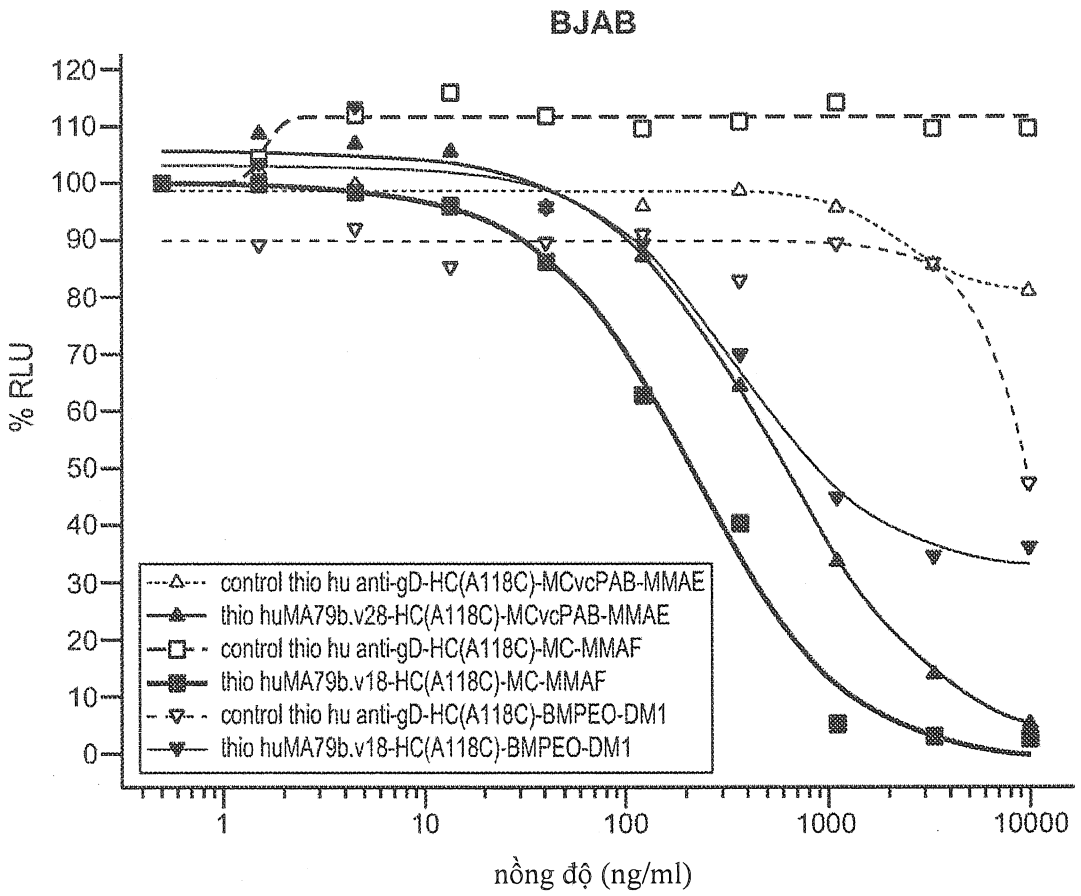

BJAB
% RLU
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
10000
nồng độ (ng/ml)
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE
thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-MC-MMAF
thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-BMPEO-DM1
thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1

FIG. 41A

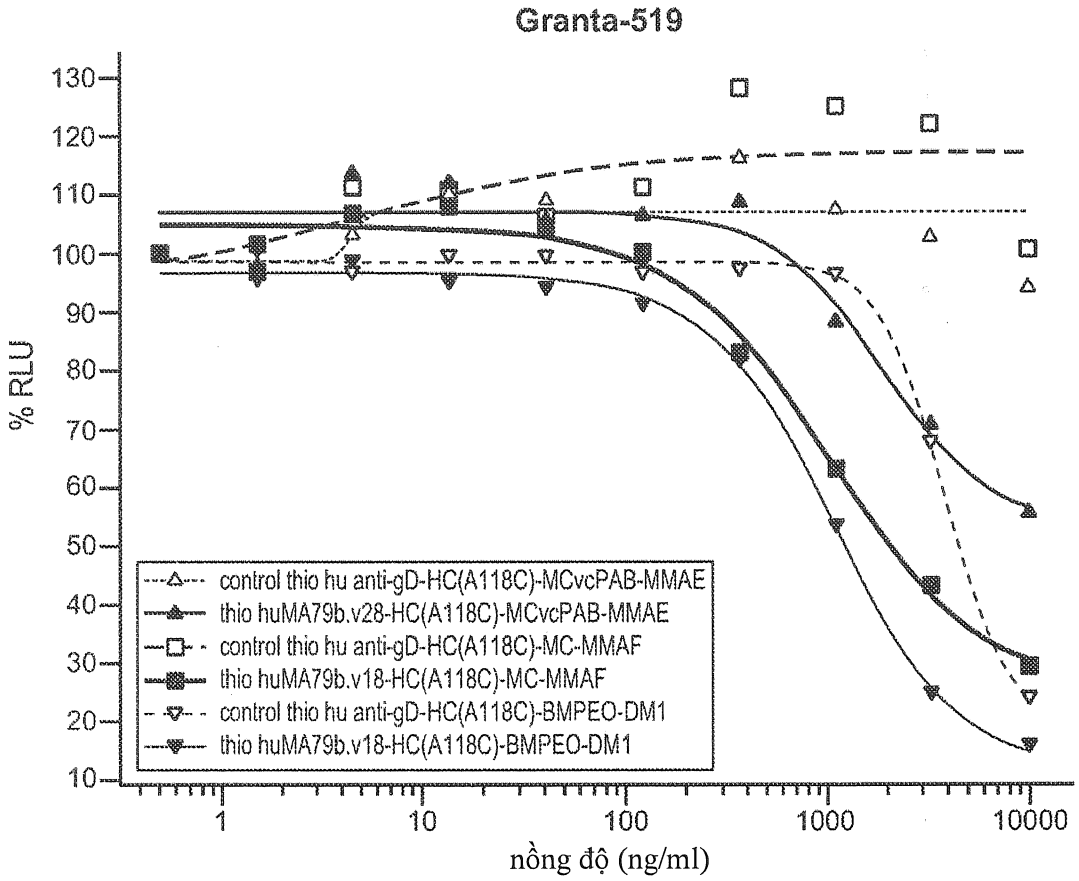

Granta-519
% RLU
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
1
10
100
1000
10000
nồng độ (ng/ml)
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE
thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-MC-MMAF
thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-BMPEO-DM1
thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1

FIG. 41B

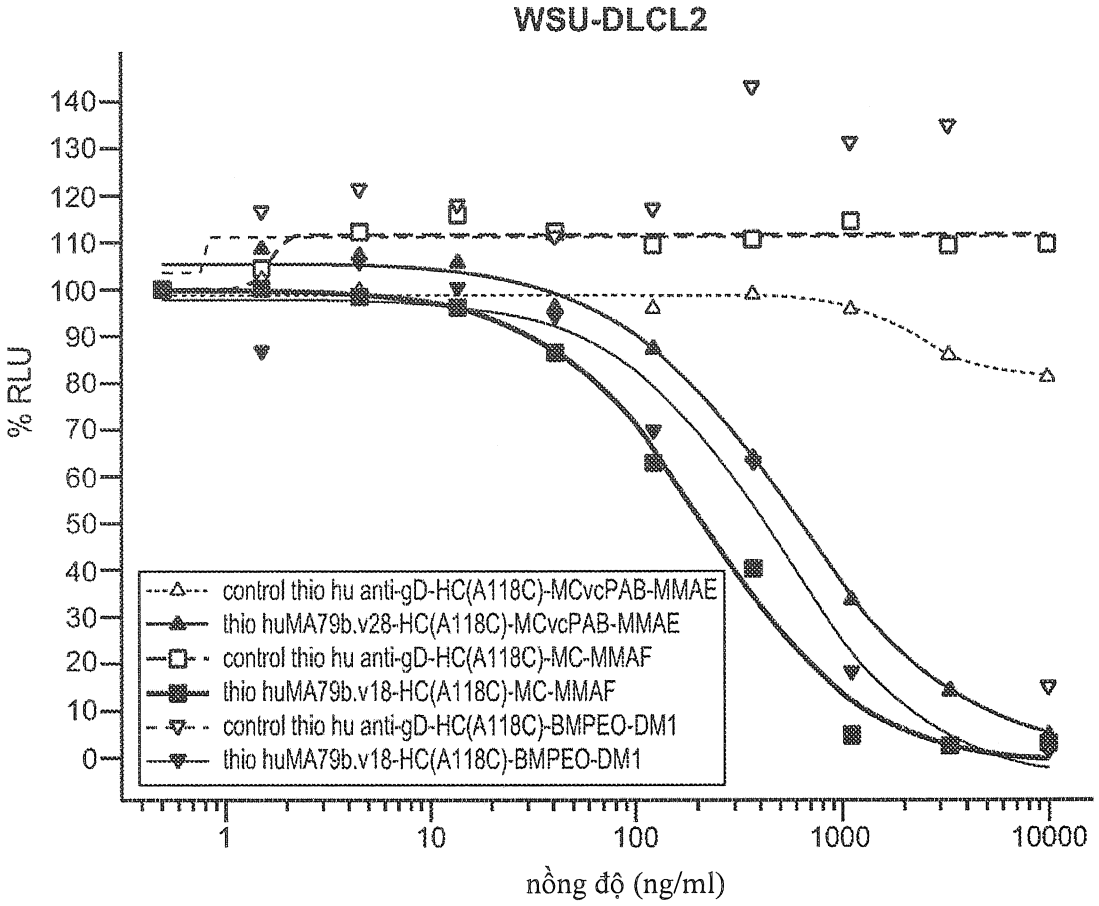

WSU-DLCL2
% RLU
140
130
120
110
100
90
80
70
60
50
40
30
20
10
0
1
10
100
1000
10000
nồng độ (ng/ml)
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE
thio huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-MC-MMAF
thio huMA79b.v18-HC(A118C)-MC-MMAF
control thio hu anti-gD-HC(A118C)-BMPEO-DM1
thio huMA79b.v18-HC(A118C)-BMPEO-DM1

FIG. 41C

<p1.cynoCD79b

TCATGGTGATGGTGATGATGACCGGTACGCGTAGAATCGAGACCGAGGAGAGGGTTAGGGATAGG
CTTACCTTCGAACCGCGGGCCCTCTAGACTCGAGCGGCCGCCACTGTGCTGGATATCTGCAGAAT
TGCCCTTGGGGACAGAGCAGTGACCATGGCCAGGCTGGCGTTGTCTCCTGTGTCCAGCCACTGGC
TGGTGGCGTTGCTGCTGCTGCTCTCAGCAGCTGAGCCAGTGCCAGCAGCCAAATCAGAGGACCTG
TACCCGAATCCCAAAGGTAGTGCTTGTTCTCGGATCTGGCAGAGCCCACGTTTCATAGCCAGGAA
ACGGGGCTTCACGGTGAAAATGCACTGCTACGTGACCAACAGCACCTTCAGCATCGTGAGCTGGC
TCCGGAAGCGGGAGACGGACAAGGAGCCCCAACAGGTGAACCTGGAGCAGGGCCACATGCATCAG
ACCCAAAACAGCTCTGTCACCACCCTCATCATCCAAGACATCCGGTTTGAGGACAACGGCATCTA
CTTCTGTCAGCAGGAGTGCAGCAAGACCTCGGAGGTCTACCGGGGCTGCGGCACGGAGCTGCGAG
TCATGGGGTTCAGCACCTTGGCACAGCTGAAGCAGAGGAACACGCTGAAGGATGGCATCATCATG
ATCCAGACGCTGCTGATCATCCTCTTCATCATCGTGCCCATCTTCCTGCTGCTGGACAAGGATGA
CAGCAAGGCCGGCATGGAGGAAGATCACACCTACGAGGGCCTGGACATTGACCAGACGGCCACCT
ACGAGGACATAGTGACGCTGCGGACAGGGGAAGTGAAGTGGTCTGTGGGTGAGCACCCAGGTCAG
GAGTGAGAGCCAGGACCTCCCCACGGCCTGGGTGCAGGCTCCCCAGCC

FIG. 42

<p1.cynoCD79b
DNA548455

MARLALSPVSSHWLVALLLLLSAAEPVPAAKSEDLYPNPKGSACSRIWQSPRFIARKRGFT
VKMHCYVTNSTFSIVSWLRKRETDKEPQQVNLEQGHMHQTQNSSVTTLIIQDIRFEDNGIY
FCQQECSKTSEVYRGCGTELRVMGFSTLAQLKQRNTLKDGIIMIQTLLIILFIIVPIFLLL
DKDDSKAGMEEDHTYEGLDIDQTATYEDIVTLRTGEVKWSVGEHPGQE

Trình tự tín hiệu.
các axit amin 1-26.
Miền chuyển màng.
các axit amin 161-181.
Miền globulin miễn dịch.
các axit amin 59-126.
Motif hoạt hoá trên tyrosin thụ thể miễn dịch.
các axit amin 195-215.
Miền bộ V globulin miễn dịch.
các axit amin 44-145.
Vị trí N-glycosyl hoá.
các axit amin 70-73, 103-106.
Vị trí phosphoryl hoá protein kinaza phụ thuộc cAMP và cGMP.
các axit amin 81-84.
Vị trí phosphoryl hoá protein kinaza C.
các axit amin 50-52, 61-63, 84-86, 158-160, 214-216.
Vị trí phosphoryl hoá casein kinaza II.
các axit amin 22-25, 84-87, 158-161, 208-211, 223-226.
Vị trí phosphoryl hoá tyrosin kinaza
các axit amin 115-122.
Vị trí N-myristoyl hoá
các axit amin 41-46, 120-125.

FIG. 43

Chuỗi nhẹ khảm kháng xyno CD79b (ch10D10)

ACCTCGGTTC TATCGATTGA ATTCCACCAT GGGATGGTCA TGTATCATCC TTTTTCTAGT
AGCAACTGCA ACTGGAGTAC ATTCAGATAT CGTGCTGACC CAATCTCCAC CCTCTTTGGC
TGTGTCTCTA GGGCAGAGGG CCACCATATC CTGCAGAGCC AGTGAAAGTG TTGATAGTTA
TGGCAAAACT TTTATGCACT GGCACCAGCA GAAACCAGGA CAGCCACCCA AACTCCTCAT
CTATCGTGTA TCCAACCTAG AATCTGGGAT CCCTGCCAGG TTCAGTGGCA GTGGGTCAAG
GACAGACTTC ACCCTCACCA TTAATCCTGT GGAGGCTGAT GATGTTGCAA CCTATTACTG
TCAGCAAAGT AATGAGGATC CGTTCACGTT CGGTGGAGGC ACCAAGCTGG AAATCAAACG
GACCGTGGCT GCACCATCTG TCTTCATCTT CCCGCCATCT GATGAGCAGT TGAAATCTGG
AACTGCCTCT GTTGTGTGCC TGCTGAATAA CTTCTATCCC AGAGAGGCCA AAGTACAGTG
GAAGGTGGAT AACGCCCTCC AATCGGGTAA CTCCCAGGAG AGTGTCACAG AGCAGGACAG
CAAGGACAGC ACCTACAGCC TCAGCAGCAC CCTGACGCTG AGCAAAGCAG ACTACGAGAA
ACACAAAGTC TACGCCTGCG AAGTCACCCA TCAGGGCCTG AGCTCGCCCG TCACAAAGAG
CTTCAACAGG GGAGAGTGTT AAGCTTGGCC GCCATGGCCC AACTTGTTTA TTGCAGCTTA
TAATGGTTAC AAATAAAGCA

FIG. 44

Chuỗi nhẹ khảm kháng xyno CD79b (ch10D10)

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC

FIG. 45

Chuỗi nặng khảm kháng xyno CD79b (ch10D10)

CACCTCGGTT CTATCGATTG AATTCCACCA TGGGATGGTC ATGTATCATC CTTTTTCTAG
TAGCAACTGC AACTGGAGTA CATTCAGAAG TTCAGCTGCA GGAGTCGGGA CCTGGCCTGG
TGAAACCTTC TCAGTCTCTG TCCCTCACCT GCACTGTCAC TGGCTACTCA ATCACCAGTG
ATTATGCCTG GAACTGGATC CGGCAGTTTC CAGGAAACAA ACTGGAGTGG ATGGGCAACA
TATGGTACAG TGGTAGCACT ACCTACAACC CATCTCTCAA AAGTCGAATC TCTATCACTC
GAGACACATC CAAGAACCAG TTCTTCCTGC AGTTGAATTC TGTGACTTCT GAGGACACAG
CCACATATTA CTGTTCAAGA ATGGACTTCT GGGGTCAAGG CACCACTCTC ACAGTCTCCT
CAGCCTCCAC CAAGGGCCCA TCGGTCTTCC CCCTGGCACC CTCCTCCAAG AGCACCTCTG
GGGGCACAGC GGCCCTGGGC TGCCTGGTCA AGGACTACTT CCCCGAACCG GTGACGGTGT
CGTGGAACTC AGGCGCCCTG ACCAGCGGCG TGCACACCTT CCCGGCTGTC CTACAGTCCT
CAGGACTCTA CTCCCTCAGC AGCGTGGTGA CTGTGCCCTC TAGCAGCTTG GGCACCCAGA
CCTACATCTG CAACGTGAAT CACAAGCCCA GCAACACCAA GGTGGACAAG AAAGTTGAGC
CCAAATCTTG TGACAAAACT CACACATGCC CACCGTGCCC AGCACCTGAA CTCCTGGGGG
GACCGTCAGT CTTCCTCTTC CCCCCAAAAC CCAAGGACAC CCTCATGATC TCCCGGACCC
CTGAGGTCAC ATGCGTGGTG GTGGACGTGA GCCACGAAGA CCCTGAGGTC AAGTTCAACT
GGTACGTGGA CGGCGTGGAG GTGCATAATG CCAAGACAAA GCCGCGGGAG GAGCAGTACA
ACAGCACGTA CCGTGTGGTC AGCGTCCTCA CCGTCCTGCA CCAGGACTGG CTGAATGGCA
AGGAGTACAA GTGCAAGGTC TCCAACAAAG CCCTCCCAGC CCCCATCGAG AAAACCATCT
CCAAAGCCAA AGGGCAGCCC CGAGAACCAC AGGTGTACAC CCTGCCCCCA TCCCGGGAAG
AGATGACCAA GAACCAGGTC AGCCTGACCT GCCTGGTCAA AGGCTTCTAT CCCAGCGACA
TCGCCGTGGA GTGGGAGAGC AATGGGCAGC CGGAGAACAA CTACAAGACC ACGCCTCCCG
TGCTGGACTC CGACGGCTCC TTCTTCCTCT ACAGCAAGCT CACCGTGGAC AAGAGCAGGT
GGCAGCAGGG GAACGTCTTC TCATGCTCCG TGATGCATGA GGCTCTGCAC AACCACTACA
CGCAGAAGAG CCTCTCCCTG TCTCCGGGTA AATGAGTGCG ACGGCCCTAG AGTCGACCTG
CAGAAGCTTG GCCGCCATGG CCCAACTTGT TTATTGCAGC TTATAATGGT TACAAATAAA

FIG. 46

Chuỗi nặng khảm kháng xyno CD79b (ch10D10)

EVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG

FIG. 47

Chuỗi nặng Thio Mab sinh xystein kháng xno CD79b ch10D10
A. Trình tự chuỗi nhẹ
Thio-kháng-xyno CD79b (ch10D10)-HC-A118C (LC)

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 245)

B. Trình tự chuỗi nặng
Thio-kháng-xyno CD79b (ch10D10)-HC-A118C (HC)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSCSTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG
(SEQ ID NO: 244)

FIG. 48

Chuỗi nhẹ ThioMAb sinh xystein kháng xyno CD79b ch10D10 V205C
A. Trình tự chuỗi nhẹ
Thio-kháng-xyno CD79b (ch10D10)-HC-V205C (LC)

DIVLTQSPPSLAVSLGQRATISCRASESVDSYGKTFMHWHQQKPGQPPKLLIYRVSNLESGIPAR
FSGSGSRTDFTLTINPVEADDVATYYCQQSNEDPFTFGGGTKLEIKRTVAAPSVFIFPPSDEQLK
SGTASVVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTLTLSKADYEKHKV
YACEVTHQGLSSPCTKSFNRGEC (SEQ ID NO: 300)

B. Trình tự chuỗi nặng
Thio-kháng-xyno CD79b (ch10D10)-HC-V205C (HC)

DVQLQESGPGLVKPSQSLSLTCTVTGYSITSDYAWNWIRQFPGNKLEWMGNIWYSGSTTYNPSLK
SRISITRDTSKNQFFLQLNSVTSEDTATYYCSRMDFWGQGTTLTVSSASTKGPSVFPLAPSSKST
SGGTAALGCLVKDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYIC
NVNHKPSNTKVDKKVEPKSCDKTHTCPPCPAPELLGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVVD
VSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALPA
PIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPSREEMTKNQVSLTCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTP
PVLDSDGSFFLYSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG (SEQ ID NO: 299)

FIG. 49

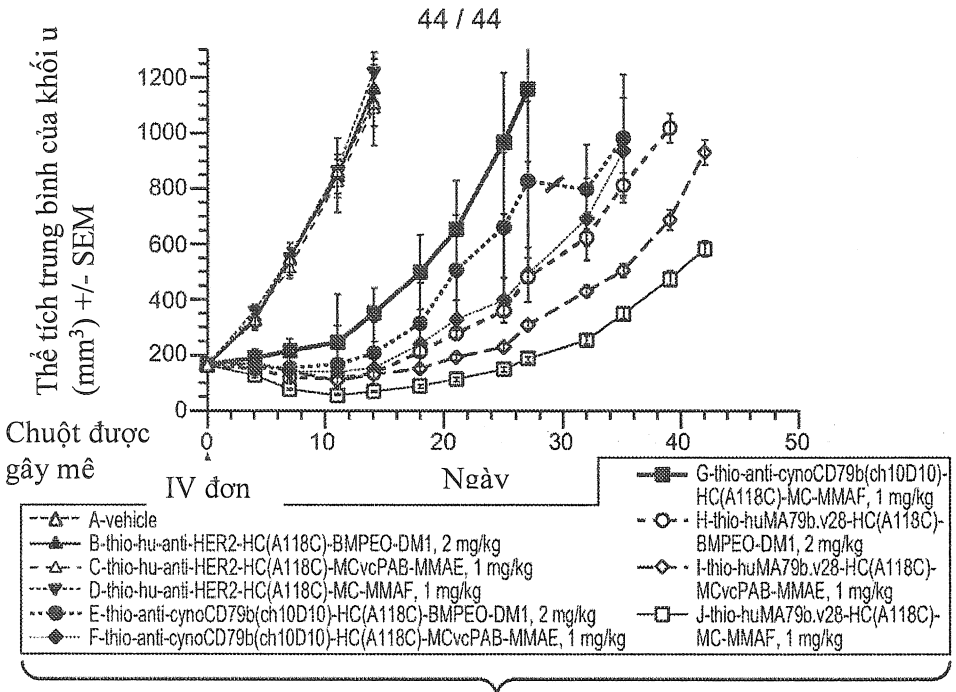

44 / 44
Thể tích trung bình của khối u
(mm3) +/- SEM
1200
1000
800
600
400
200
0
0
10
20
30
40
50
Chuột được
gây mê
IV đơn
Ngày
A-vehicle
B-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 2 mg/kg
C-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 1 mg/kg
D-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-MC-MMAF, 1 mg/kg
E-thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 2 mg/kg
F-thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 1 mg/kg
G-thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-MC-MMAF, 1 mg/kg
H-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 2 mg/kg
I-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MCvcPAB-MMAE, 1 mg/kg
J-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-MC-MMAF, 1 mg/kg

FIG. 50

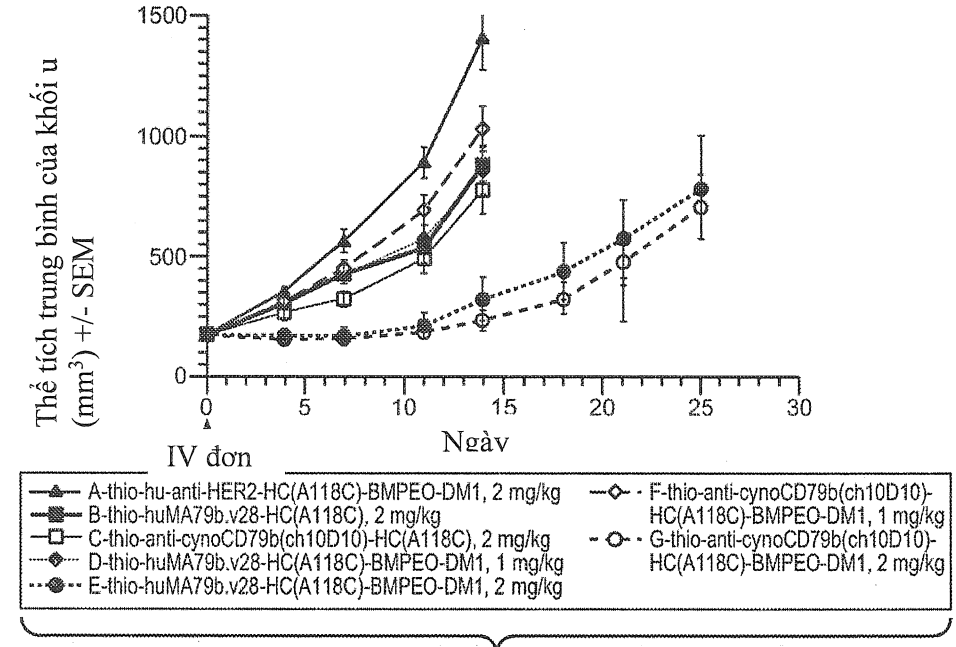

Thể tích trung bình của khối u
(mm3) +/- SEM
1500
1000
500
0
0
5
10
15
20
25
30
IV đơn
Ngày
A-thio-hu-anti-HER2-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 2 mg/kg
B-thio-huMA79b.v28-HC(A118C), 2 mg/kg
C-thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C), 2 mg/kg
D-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 1 mg/kg
E-thio-huMA79b.v28-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 2 mg/kg
F-thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 1 mg/kg
G-thio-anti-cynoCD79b(ch10D10)-HC(A118C)-BMPEO-DM1, 2 mg/kg

FIG. 51