



(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)



1-0032294

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2018-01226

(22) 30/09/2016

(86) PCT/EP2016/073412 30/09/2016

(87) WO 2017/055541 06/04/2017

(30) 15187820.4 01/10/2015 EP

(45) 25/06/2022 411

(43) 27/08/2018 365A

(73) F. HOFFMANN-LA ROCHE AG (CH)

Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland

(72) GEORGES, Guy (BE); MOESSNER, Ekkehard (DE); LARIVIERE, Laurent (FR);

HAAS, Alexander (DE); KETTENBERGER, Hubert (DE); FERRARA KOLLER,

Claudia (CH); SCHLOTHAUER, Tilman (DE); MOLHOJ, Michael (DK).

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

(54) KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD19 Ở NGƯỜI ĐƯỢC LÀM GIỐNG
NHƯ CỦA NGƯỜI VÀ ĐƯỢC PHẪM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người, trong đó kháng thể này có (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, (c) HVR-EB chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 hoặc 28, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08, cũng như phương pháp sử dụng kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể được làm giống người kháng CD19 ở người (kháng thể kháng CD19 ở người), phương pháp sản xuất chúng, dược phẩm chứa các kháng thể này, và việc sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

CD19 ở người là protein liên màng 95 kDa (đồng thụ thể tế bào B) được biểu hiện duy nhất trên các tế bào B và trên các tế bào có tua ở nang. CD 19 được tìm thấy có sự liên quan với CD21 và CD81. CD19 và CD21 được yêu cầu cho sự biệt hóa tế bào B bình thường (Carter, R.H., et al., Immunol. Res. 26 (2002) 45-54). Các kháng thể kháng CD19 được sử dụng trong nhiều thử nghiệm lâm sàng (xem ví dụ Hekman, A., et al., Cancer Immunol. Immunother. 32 (191) 364-372; Vlasfeld, L.T., et al., Cancer Immunol. Immunother. 40 (1995) 37-47; Conry, R.M., et al., J. Immunother. Emphasis Tumor Immunol. 18 (1995) 231-241; Manzke, O., et al., Int. J. Cancer 91 (2001) 516-522).

Kháng thể kháng CD19 ví dụ được nêu trong WO 2004/106381, WO 2005/012493, WO 2006/089133, WO 2007/002223, WO 2006/133450, WO 2006/121852, WO 2003/048209, US 7,109,304, US 2006/0233791, US 2006/0280738, US 2006/0263357, US 2006/0257398, EP 1648512, EP 1629012, US 2008/0138336, WO 2008/022152 và trong tài liệu: Bruenke, J., et al., Br. J. Hematol. 130 (2005) 218-228; Vallera, D.A., et al., Cancer Biother. Radiopharm. 19 (2004) 11-23; Ghetie, M.A., et al., Blood 104 (2004) 178-183; Lang, P., et al., Blood 103 (2004) 3982-3985; Loeffler, A., et al., Blood 95 (2000) 2098-2103; Le Gall, F., et al., FEBS Lett. 453 (1999) 164-168; Li, Q., et al., Cancer Immunol. Immunother. 47 (1998) 121-130; Eberl, G., et al., Clin. Exp. Immunol. 114 (1998) 173-178; Pietersz, G.A., et al., Cancer Immunol. Immunother. 41 (1995) 53-60; Myers, D.E., et al., Leuk. U lympho. 18 (1995) 93-102; Bejcek, B.E., et al., Cancer Res. 55 (1995) 2346-2351; Hagen, I.A., et al., Blood 85 (1995) 3208-3212; Vlasfeld, L.T., et al., Cancer Immunol. Immunother. 40 (1995) 37-47; Rhodes, VÍ DỤ et al., Bone Marrow Transplant. 10 (1992) 485-489; Zola, H., et al., Immunol. tế bào Biol. 69 (1991) 411-422; Watanabe, M., et al., Cancer Res. 50 (1990)

3245-3248; Uckun, F.M., et al., Blood 71 (1988) 13-29; Pezzutto, A., et al.; J Immunol. 138 (1987) 2793-2799. Kháng thể đơn dòng SJ25-C1 có thể mua được trên thị trường (số sản phẩm 4737, Sigma-Aldrich Co. USA, SEQ ID NO: 21 đến 24). Kháng thể có ái lực tăng đối với FcγRIIIA được nêu trong WO 2008/022152.

Kháng thể kháng CD19 có thể có tác dụng ức chế hoặc kích thích sự hoạt hóa tế bào B. Việc kháng thể CD19 liên kết với tế bào B kích thích bởi tác nhân gây phân bào ức chế sự tăng Ca^{2+} sau đó và sự hoạt hóa và tăng sinh của các tế bào này và sự tăng sinh và sự biệt hóa của tế bào B có thể được ức chế hoặc được tăng cường bởi kháng thể CD19 tùy thuộc vào chất kích thích phân bào được sử dụng và mức độ liên kết ngang bởi kháng thể này.

Trong WO 2004/106381, dược phẩm chứa các cấu trúc kháng thể kháng CD19, kháng CD3 đặc hiệu kép để điều trị các rối loạn liên quan đến tế bào B được báo cáo. Các kháng thể kháng CD19 được nêu trong WO 2005/012493. Trong WO 2006/089133, các kháng thể kháng CD19 và việc sử dụng chúng trong ung thư học được báo cáo. Kháng thể kháng CD19 và việc sử dụng chúng được nêu trong WO 2007/002223. Trong WO 2006/133450 liệu pháp sử dụng kháng thể kháng CD19 để cấy ghép được báo cáo.

Trong WO 2011/147834 các kháng thể kháng CD19 và việc sử dụng chúng được báo cáo.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế đề xuất các kháng thể kháng CD19 (ở người) hữu ích làm chất điều trị để điều trị bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương hoặc để điều trị khối u.

Sáng chế một phần dựa trên việc phát hiện ra rằng để loại bỏ nhiều điểm khử amin trong kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người thì một đột biến là đủ.

Các kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có các tính chất mang lại lợi ích cho bệnh nhân mắc bệnh liên quan đến tăng tế bào B bệnh lý.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người, trong đó kháng thể này chứa:

- (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03,

- (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11,
- (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05,
- (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 hoặc 28,
- (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và
- (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.

Theo một phương án, kháng thể này là kháng thể đơn dòng.

Theo một phương án, kháng thể này là kháng thể ở người, kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể khảm.

Theo một phương án, kháng thể này là mảnh kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người.

Theo một phương án, kháng thể này chứa:

(a) trình tự VH có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 09 ít nhất là 95% và trình tự VL có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19 ít nhất là 95%, hoặc

(b) trình tự VH có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 09 ít nhất là 95% và trình tự VL có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 ít nhất là 95%, hoặc

(c) trình tự VH và trình tự VL như trong (a) hoặc (b).

Theo một phương án, kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người và kháng nguyên thứ hai khác.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là chế phẩm thuốc chứa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này và chất mang được dùng.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để điều trị tế bào B ác tính. Theo một phương án, tế bào B ác tính được chọn từ nhóm bao gồm CLL, NHL và DLBCL.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để sử dụng làm thuốc.

Theo một phương án, thuốc này để điều trị ung thư tế bào B, bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Theo một phương án, thuốc này để làm tiêu tế bào B.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị ung thư tế bào B, bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để sử dụng trong việc làm tiêu tế bào B.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là sử dụng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này để điều trị ung thư tế bào B, bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Theo một phương án, thuốc này để làm tiêu tế bào B.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là phương pháp điều trị cho cá thể mắc ung thư tế bào B bao gồm việc cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể như được nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là phương pháp làm tiêu tế bào B trong cá thể bao gồm việc cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể như được nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là phương pháp bào chế thuốc để điều trị bệnh chứa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này. Theo một phương án, bệnh này là bệnh ung thư tế bào B, bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là tế bào chủ chứa axit nucleic như được nêu trong bản mô tả này.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là phương pháp sản xuất kháng thể bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể sao cho kháng thể này được tạo ra, khôi phục kháng thể từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy và tinh chế kháng thể.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này và chất gây độc tế bào.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Định nghĩa

“Khung làm việc của thể nhận ở người” cho mục đích trong bản mô tả này là khung làm việc chứa trình tự axit amin của khung làm việc miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung làm việc miền biến đổi chuỗi nặng (VH) thu được từ khung làm việc globulin miễn dịch ở người hoặc khung làm việc liên ứng ở người, như được mô tả dưới đây. Khung làm việc của thể nhận ở người “thu được từ” khung làm việc globulin miễn dịch ở người hoặc khung làm việc liên ứng ở người có thể chứa cùng trình tự axit amin của nó, hoặc nó có thể chứa các thay đổi trình tự axit amin. Theo một vài phương án, số axit amin thay đổi là 10 hoặc ít hơn, 9 hoặc ít hơn, 8 hoặc ít hơn, 7 hoặc ít hơn, 6 hoặc ít hơn, 5 hoặc ít hơn, 4 hoặc ít hơn, 3 hoặc ít hơn, hoặc 2 hoặc ít hơn. Theo một vài phương án, khung làm việc VL của thể nhận ở người tương đồng về trình tự đối với trình tự khung làm việc VL globulin miễn dịch ở người hoặc trình tự khung làm việc liên ứng ở người.

“Ái lực” đề cập đến độ mạnh tổng của tương tác không cộng hóa trị giữa một vị trí liên kết duy nhất của một phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tượng liên kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi có quy định khác, như được sử dụng trong bản mô tả này, “ái lực liên kết” đề cập đến ái lực liên kết bên phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp liên kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với đối tượng Y của nó có thể thường được biểu hiện bằng hằng số phân ly (k_d). Ái lực có thể được xác định bằng các phương pháp phổ biến đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể “thuần thực ái lực” đề cập đến kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi ở một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR - hypervariable region), so với kháng thể gốc mà không có các thay đổi này, các thay đổi này dẫn đến cải thiện ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Thuật ngữ “kháng thể kháng CD19 ở người” và “kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người” đề cập đến kháng thể mà có thể liên kết CD19 ở người bằng ái lực đủ để kháng thể hữu ích làm chất chẩn đoán và/hoặc chất điều trị trong CD19 ở người

hướng đích. Theo một phương án, mức độ liên kết của kháng thể kháng CD19 ở người với protein không phải CD19 không liên quan nhỏ hơn khoảng 10% liên kết của kháng thể với CD19 ở người như được xác định, bằng cộng hưởng plasmon bề mặt (Surface Plasmon Resonance). Theo các phương án nhất định, kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người có hằng số phân ly (K_D) bằng 10^{-8} M hoặc ít hơn.

Thuật ngữ "kháng thể" trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở, kháng thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), và mảnh kháng thể miễn là chúng thể hiện hoạt tính liên kết kháng nguyên mong muốn.

Thuật ngữ "tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity)" là chức năng trung gian bởi liên kết thụ thể Fc và đề cập đến sự phân giải của các tế bào đích bằng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này trong sự có mặt của các tế bào tác động. Theo một phương án, ADCC được xác định bằng việc xử lý ở bước chuẩn bị tế bào thuộc dòng hồng cầu biểu hiện CD19 (ví dụ các tế bào K562 biểu hiện CD19 tái tổ hợp ở người) bằng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này trong sự có mặt của các tế bào tác động như PBMC mới được phân lập (tế bào đơn nhân máu ngoại vi) hoặc các tế bào tác động được tinh khiết từ lớp đệm, như bạch cầu đơn nhân hoặc các tế bào NK (các tế bào giết tự nhiên). Các tế bào đích được đánh dấu bằng ^{51}Cr và sau đó được ủ với kháng thể. Các tế bào được đánh dấu này được ủ với các tế bào tác động và dịch nổi được phân tích đối với ^{51}Cr được giải phóng. Đối chứng bao gồm việc ủ tế bào nội mô đích với các tế bào tác động nhưng không có kháng thể. Khả năng của kháng thể để cảm ứng ADCC trung gian bước khởi đầu được nghiên cứu bằng cách xác định liên kết của chúng với các tế bào biểu hiện thụ thể Fc γ , như các tế bào, Fc γ RI và/hoặc Fc γ RIIA biểu hiện tái tổ hợp hoặc các tế bào NK (Fc γ RIIA biểu hiện về bản chất). Theo một phương án được ưu tiên, việc liên kết với Fc γ R trên các tế bào NK được xác định.

"Mảnh kháng thể" đề cập đến phân tử kháng thể nguyên vẹn mà chứa phần kháng thể nguyên vẹn liên kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn liên kết với. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; kháng thể thể đôi; kháng thể thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ scFv); và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Thuật ngữ kháng thể "khảm" đề cập đến kháng thể trong đó một phân chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ thu được từ nguồn hoặc loài cụ thể, trong đó phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ thu được từ nguồn hoặc loài khác.

Thuật ngữ "lớp" của kháng thể đề cập đến loại miền hằng định hoặc vùng hằng định thuộc chuỗi nặng của nó. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và các lớp này có thể còn được chia thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂, IgG₃, IgG₄, IgA₁, và IgA₂. Miền hằng định chuỗi nặng tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là α , δ , ϵ , γ , và μ , một cách tương ứng.

Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến chất mà ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng tế bào và/hoặc gây chết hoặc phá hủy tế bào. Chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các đồng vị phóng xạ (ví dụ, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² và các đồng vị phóng xạ của Lu); chất hoặc thuốc hóa trị (ví dụ, methotrexat, adriamixin, vinca alkaloid (vincristin, vinblastin, etoposin), doxorubicin, melphalan, mitomycin C, clorambucil, daunorubicin hoặc các chất xen vào khác); chất ức chế sinh trưởng; enzym và mảnh của nó như enzym thủy phân axit nucleic; chất kháng sinh; độc tố như độc tố phân tử nhỏ hoặc độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các mảnh và/hoặc các biến thể của nó; và các chất kháng khối u hoặc chất kháng ung thư khác được bộc lộ dưới đây.

Thuật ngữ "tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement-dependent cytotoxicity)" đề cập đến sự phân giải các tế bào gây ra bởi kháng thể như được nêu trong bản mô tả này trong sự có mặt của bổ thể. Theo một phương án, CDC được xác định bằng việc xử lý tế bào nội mô ở người biểu hiện CD19 bằng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này trong sự có mặt của bổ thể. Theo một phương án, các tế bào này được đánh dấu bằng calcein. CDC được phát hiện nếu kháng thể này gây ra sự phân giải các tế bào đích 20% hoặc nhiều hơn ở nồng độ 30 $\mu\text{g/ml}$. Liên kết với yếu tố bổ thể C1q có thể được xác định trong ELISA. Trong thử nghiệm này theo nguyên tắc tấm ELISA được phủ trong khoảng nồng độ của kháng thể, bổ sung C1q ở người hoặc huyết thanh người được tinh chế vào. Liên kết C1q được phát hiện bằng kháng thể kháng trực tiếp C1q, sau đó liên hợp đánh dấu peroxidaza. Việc phát hiện liên kết (liên kết tối đa

$B_{\max}$) được xác định khi mật độ quang ở 405 nm (OD405) đối với cơ chất peroxidaza ABTS® (2,2'-azino-di-[3-etylbenzthiazolin-6-sulfonat (6)]).

“Chức năng của chất tác động” đề cập đến hoạt tính sinh học của chất tác động có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, mà thay đổi theo lớp kháng thể. Các ví dụ về chức năng của chất tác động kháng thể bao gồm: liên kết C1q và tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement dependent cytotoxicity); liên kết thụ thể Fc; tính độc tế bào trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity); thực bào; điều hòa ngược thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ thụ thể tế bào B); và sự hoạt hóa tế bào B.

Chức năng của chất tác động phụ thuộc liên kết thụ thể Fc có thể được trung gian bởi sự tương tác của vùng Fc của kháng thể với thụ thể Fc (FcR - Fc receptor), là thụ thể bề mặt tế bào biệt hóa trên các tế bào tạo huyết. Thụ thể Fc thuộc siêu họ globulin miễn dịch, và được thể hiện để gây ra việc loại bỏ mầm bệnh phủ kháng thể bằng thực bào của các phức chất miễn dịch, và sự phân giải của hồng cầu và nhiều đích tế bào khác nhau (ví dụ các tế bào khối u) được phủ bằng kháng thể tương ứng, nhờ tính độc tế bào trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cell-mediated cytotoxicity) (xem ví dụ Van de Winkel, J.G. và Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). FcR được xác định bởi tính đặc hiệu của chúng đối với isotyp globulin miễn dịch: thụ thể Fc đối với kháng thể IgG được đề cập đến là FcγR. Liên kết thụ thể Fc được mô tả ví dụ trong Ravetch, J.V. và Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M., et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; và Gessner, J.E., et al., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

Liên kết ngang của thụ thể đối với vùng Fc của kháng thể IgG (FcγR) khởi động một loạt các chức năng của chất tác động bao gồm thực bào, tính độc tế bào phụ thuộc kháng thể, và giải phóng các chất điều biến viêm, cũng như sự thanh thải phức hợp miễn dịch và sự điều hòa sản xuất kháng thể. Ở người, ba lớp FcγR được đặc trưng, là:

- FcγRI (CD64) liên kết IgG dạng monome có ái lực cao và được biểu hiện trên đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính và bạch cầu ái toan. Sự cải biến trong vùng Fc IgG ít nhất ở một trong số các gốc axit amin E233-G236, P238, D265, N297, A327 và P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat) làm giảm liên kết với

FcγRI. Các gốc IgG2 ở vị trí 233–236, được thể vào IgG1 và IgG4, giảm liên kết với FcγRI xuống 10^3 lần và làm giảm đáp ứng của bạch cầu đơn nhân ở người với các tế bào hồng cầu được làm nhạy bằng kháng thể (Armour, K.L., et al., Eur. J. Immunol. 29 (1999) 2613–2624).

– FcγRII (CD32) liên kết IgG được tạo phức với ái lực từ trung bình đến thấp và được biểu hiện rộng rãi. Thụ thể này có thể được chia thành hai kiểu phụ, FcγRIIA và FcγRIIB. FcγRIIA được phát hiện trên nhiều tế bào liên quan đến việc giết (ví dụ đại thực bào, bạch cầu đơn nhân, bạch cầu trung tính) và có vẻ có thể hoạt hóa quá trình giết. FcγRIIB có vẻ giữ vai trò trong quá trình ức chế và được phát hiện trên tế bào B, đại thực bào và trên các tế bào lớn và bạch cầu ái toan. Trên tế bào B nó có vẻ có chức năng ức chế sản xuất globulin miễn dịch khác và isotyp chuyển thành, ví dụ, lớp IgE. Trên các đại thực bào, FcγRIIB hoạt động để ức chế thực bào làm trung gian qua FcγRIIA. Trên bạch cầu ái toan và các tế bào lớn dạng B có thể giúp để ức chế sự hoạt hóa của các tế bào này qua liên kết IgE với thụ thể riêng rẽ của nó. Liên kết đối với FcγRIIA được làm giảm được phát hiện ví dụ đối với kháng thể chứa vùng Fc IgG có đột biến ở ít nhất ở một trong số các gốc axit amin E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292, và K414 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

– FcγRIII (CD16) liên kết IgG với ái lực từ trung bình đến thấp và tồn tại dưới dạng hai loại. FcγRIIIA được phát hiện trên các tế bào NK, đại thực bào, bạch cầu ái toan và một vài bạch cầu đơn nhân và các tế bào T và trung gian ADCC. FcγRIIB được biểu hiện cao trên bạch cầu trung tính. Phát hiện thấy giảm liên kết với FcγRIIIA ví dụ đối với kháng thể chứa vùng Fc IgG có đột biến ở ít nhất ở một trong các gốc axit amin E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, S239, E269, E293, Y296, V303, A327, K338 và D376 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Bản đồ vị trí liên kết trên IgG1 ở người đối với thụ thể Fc, vị trí đột biến được đề cập ở trên và phương pháp xác định liên kết với FcγRI và FcγRIIA được mô tả bởi Shields, R.L., và các đồng tác giả J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604.

"Lượng hữu hiệu" của chất, ví dụ, chế phẩm thuốc, đề cập đến lượng hữu hiệu, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả điều trị hoặc phòng ngừa mong muốn.

Thuật ngữ “thụ thể Fc” như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến sự hoạt hóa thụ thể được đặc trưng bởi sự có mặt của trình tự ITAM bào tương liên quan đến thụ thể (xem ví dụ Ravetch, J.V. và Bolland, S., *Annu. Rev. Immunol.* 19 (2001) 275-290). Các thụ thể này là FcγRI, FcγRIIA và FcγRIIIA. Thuật ngữ “không liên kết của FcγR” chỉ ra rằng ở nồng độ kháng thể bằng 10 µg/ml liên kết của kháng thể như được nêu trong bản mô tả này với các tế bào NK bằng 10% hoặc ít hơn liên kết được tìm thấy đối với kháng thể LC.001 kháng OX40L như được nêu trong WO 2006/029879.

Trong khi IgG4 thể hiện liên kết FcR giảm, kháng thể của phân lớp IgG khác thể hiện liên kết mạnh. Tuy nhiên, Pro238, Asp265, Asp270, Asn297 (mắt Fc hydrat cacbon), Pro329 và 234, 235, 236 và 237 Ile253, Ser254, Lys288, Thr307, Gln311, Asn434, và His435 là các gốc mà nếu được thay đổi cũng làm giảm liên kết FcR (Shields, R.L., et al. *J. Biol. Chem.* 276 (2001) 6591-6604; Lund, J., et al., *FASEB J.* 9 (1995) 115-119; Morgan, A., et al., *Immunology* 86 (1995) 319-324; và EP 0 307 434). Theo một phương án, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này là của phân lớp IgG1 hoặc IgG2 và chứa đột biến PVA236, GLPSS331, và/hoặc L234A/L235A. Theo một phương án, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này là của phân lớp IgG4 và chứa đột biến L235E. Theo một phương án, kháng thể còn chứa đột biến S228P.

Thuật ngữ “vùng Fc” trong bản mô tả này được sử dụng để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần của vùng hằng định. Thuật ngữ bao gồm vùng Fc trình tự tự nhiên và vùng Fc biến thể. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG ở người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin có đầu tận C (Lys447) của vùng Fc có thể hoặc không thể có mặt. Trừ khi có chỉ dẫn khác, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định theo hệ thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả bởi Kabat, E.A. và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.

Kháng thể như được nêu trong bản mô tả này chứa vùng Fc, theo một phương án, vùng Fc thu được có nguồn gốc từ người. Theo một phương án, vùng Fc chứa tất cả các phần của vùng hằng định ở người. Vùng Fc của kháng thể liên quan trực tiếp đến sự hoạt hóa bổ thể, liên kết C1q, sự hoạt hóa C3 và liên kết thụ thể Fc. Trong khi sự ảnh

hưởng của kháng thể trên hệ thống bổ thể phụ thuộc vào các điều kiện nhất định, liên kết với C1q gây ra bởi vị trí liên kết được xác định trong vùng Fc. Các vị trí liên kết này được biết trong tình trạng kỹ thuật của sáng chế và được mô tả ví dụ bởi Lukas, T.J., và các đồng tác giả, *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., và Cebra, J. J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., và các đồng tác giả, *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., và các đồng tác giả, *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., và các đồng tác giả, *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184; Hezareh, M., và các đồng tác giả, *J. Virol.* 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., và các đồng tác giả, *Immunology* 86 (1995) 319-324; và EP 0 307 434. Các vị trí liên kết này ví dụ là L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 và P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat; trừ khi có chỉ dẫn khác, việc đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định theo hệ thống đánh số EU, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong Kabat, E.A. và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242). Kháng thể của phân lớp IgG1, IgG2 và IgG3 thường thể hiện sự hoạt hóa bổ thể, liên kết C1q và sự hoạt hóa C3, trong đó IgG4 không hoạt hóa hệ thống bổ thể, không liên kết C1q và không hoạt hóa C3. “Vùng Fc của kháng thể” là thuật ngữ đã biết đối với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật và xác định cơ bản sự phân cắt papain của kháng thể. Theo một phương án, vùng Fc là vùng Fc ở người. Theo một phương án, vùng Fc là của phân lớp IgG4 ở người chứa các đột biến S228P và/hoặc L235E (đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án, vùng Fc là của phân lớp IgG1 ở người chứa các đột biến L234A và L235A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

"Khung làm việc" hoặc "FR" đề cập đến các gốc ở miền biến đổi khác các gốc ở vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường bao gồm bốn vùng FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Ngoài ra, trình tự HVR và FR thường xuất hiện trong trình tự sau đây trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Thuật ngữ “kháng thể có chiều dài đầy đủ”, “kháng thể nguyên vẹn,” và “toàn bộ kháng thể” như được sử dụng trong bản mô tả này thay thế lẫn nhau để đề cập đến kháng thể có cấu trúc về cơ bản tương tự với cấu trúc kháng thể tự nhiên hoặc có chuỗi nặng chứa vùng Fc như được mô tả trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "tế bào chủ", "dòng tế bào chủ", và "nuôi cấy tế bào chủ" được sử dụng thay thế lẫn nhau và đề cập đến các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh được đưa vào, bao gồm thế hệ sau của các tế bào này. Các tế bào chủ bao gồm "các tế bào biến nạp" và "các tế bào được biến nạp" mà bao gồm tế bào được biến nạp sơ cấp và thế hệ sau thu được từ đó mà không liên quan đến số thế hệ. Thế hệ sau có thể không hoàn toàn đồng nhất về hàm lượng axit nucleic với tế bào bố mẹ, nhưng có thể chứa đột biến. Thế hệ sau đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc được chọn đối với tế bào được biến nạp ban đầu được nêu trong bản mô tả này.

“Khung làm việc liên ứng ở người” là khung làm việc thể hiện các gốc axit amin tồn tại phổ biến nhất trong sự chọn lọc trình tự khung làm việc VL hoặc VH globulin miễn dịch ở người. Thông thường, việc chọn lọc trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch ở người từ nhóm phụ của trình tự miền biến đổi. Thông thường, nhóm phụ của trình tự là nhóm phụ như trong Kabat, E.A. và các đồng tác giả, *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, nhóm phụ này là nhóm phụ kappa I như trong Kabat và các đồng tác giả, *ở trên*. Theo một phương án, đối với VH, nhóm phụ này là nhóm phụ III như trong Kabat và các đồng tác giả, *ở trên*.

Kháng thể “được làm giống người” đề cập đến kháng thể khảm chứa các gốc axit amin từ HVR không phải ở người và các gốc axit amin từ FR ở người. Theo các phương án nhất định, kháng thể được làm giống người sẽ chứa gần như tất cả của ít nhất một, và thông thường hai, miền biến đổi, trong đó tất cả hoặc gần như tất cả các HVR (ví dụ, CDR) tương ứng với miền biến đổi của kháng thể không phải ở người, và tất cả hoặc gần như tất cả FR tương ứng với miền biến đổi của kháng thể ở người. Kháng thể được làm giống người tùy ý có thể chứa ít nhất một phần vùng hằng định kháng thể thu được từ kháng thể ở người. “Dạng được làm giống người” của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải ở người, đề cập đến kháng thể mà trải qua quá trình làm giống người.

Thuật ngữ “vùng siêu biến” hoặc “HVR”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến một trong số vùng của miền biến đổi kháng thể chứa gốc axit amin kéo căng là siêu biến trong trình tự (“vùng xác định tính bổ sung” hoặc “CDR”) và/hoặc tạo ra vòng xác định cấu trúc (“vùng siêu biến”), và/hoặc chứa các gốc tiếp xúc kháng nguyên

("tiếp xúc kháng nguyên"). Thông thường, kháng thể chứa sáu HVR; ba trong VH (H1, H2, H3), và ba trong VL (L1, L2, L3).

HVR bao gồm:

- (a) vòng siêu biến tồn tại ở các gốc axit amin 26-32 (L1), 50-52 (L2), 91-96 (L3), 26-32 (H1), 53-55 (H2), và 96-101 (H3) (Chothia, C. và Lesk, A.M., J. Mol. Biol. 196 (1987) 901-917);
- (b) Các CDR tồn tại ở các gốc axit amin 24-34 (L1), 50-56 (L2), 89-97 (L3), 31-35b (H1), 50-65 (H2), và 95-102 (H3) (Kabat, E.A. et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991), NIH Publication 91-3242.);
- (c) các gốc tiếp xúc kháng nguyên tồn tại ở các gốc axit amin 27c-36 (L1), 46-55 (L2), 89-96 (L3), 30-35b (H1), 47-58 (H2), và 93-101 (H3) (MacCallum et al. J. Mol. Biol. 262: 732-745 (1996)); và
- (d) sự kết hợp của (a), (b), và/hoặc (c), bao gồm các gốc axit amin 46-56 (L2), 47-56 (L2), 48-56 (L2), 49-56 (L2), 26-35 (H1), 26-35b (H1), 49-65 (H2), 93-102 (H3), và 94-102 (H3).

Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc FR) được đánh số trong bản mô tả này theo Kabat và các đồng tác giả, ở trên.

"Thể liên hợp miễn dịch" là kháng thể liên hợp với một hoặc nhiều phân tử khác loại, bao gồm nhưng không giới hạn ở, chất gây độc tế bào.

"Cá thể" hoặc "đối tượng" là động vật có vú. Động vật có vú bao gồm, nhưng không giới hạn ở, động vật nuôi trong nhà (ví dụ bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), động vật linh trưởng (ví dụ, người và động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và loài gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo các phương án nhất định, cá thể hoặc đối tượng là người.

Kháng thể "được phân lập" là kháng thể được tách từ thành phần môi trường tự nhiên của nó. Theo một vài phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bởi, ví dụ, điện di (ví dụ, SDS-PAGE, sự điều tiêu đẳng điện (IEF - isoelectric focusing), điện di mao dẫn) hoặc sắc ký (ví dụ, trao đổi

ion hoặc HPLC pha đảo). Để xem xét phương pháp đánh giá độ tinh khiết kháng thể, xem, ví dụ, Flatman, S. và các đồng tác giả, J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Axit nucleic “được phân lập” đề cập đến phân tử axit nucleic mà được tách ra từ thành phần môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic có trong các tế bào thường chứa phân tử axit nucleic này, nhưng phân tử axit nucleic này có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở trên nhiễm sắc thể có vị trí khác vị trí trên nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

“Axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng CD19 ở người” đề cập đến một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc mảnh của nó), bao gồm (các) phân tử axit nucleic trong một vector hoặc vector riêng lẻ, và (các) phân tử axit nucleic này có mặt ở một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

Thuật ngữ "kháng thể đơn dòng" như được sử dụng trong bản mô tả này đề cập đến kháng thể thu được từ tập hợp của các kháng thể gần như tương đồng, nghĩa là, các kháng thể riêng lẻ chứa tập hợp là đồng nhất và/hoặc liên kết cùng epitop, ngoại trừ kháng thể biến thể có thể, ví dụ, chứa đột biến xảy ra tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với lượng nhỏ. Trái ngược với chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường chứa các kháng thể khác nhau kháng trực tiếp các yếu tố quyết định khác nhau (epitop), mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng kháng trực tiếp một yếu tố quyết định trên kháng nguyên. Do đó, từ bỏ nghĩa “đơn dòng” chỉ ra đặc tính của kháng thể khi thu được từ tập hợp gần như tương đồng của kháng thể, và không được hiểu là sự yêu cầu sản xuất kháng thể bằng bất kỳ phương pháp cụ thể nào. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng một loạt các kỹ thuật, bao gồm nhưng không giới hạn ở, phương pháp thể lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp thể hiện thực khuẩn thể, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần của vị trí globulin miễn dịch ở người, các phương pháp này và các phương pháp tiêu biểu khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được mô tả trong bản mô tả này.

“Kháng thể trần” đề cập đến kháng thể mà không liên hợp với gốc khác loại (ví dụ, gốc độc tế bào) hoặc đánh dấu bằng đồng vị phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt trong chế phẩm thuốc.

"Kháng thể tự nhiên" đề cập đến các phân tử globulin miễn dịch tồn tại tự nhiên có sự thay đổi cấu trúc. Ví dụ, kháng thể IgG tự nhiên là glycoprotein dị tứ cực khoảng 150.000 dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ đồng nhất và hai chuỗi nặng đồng nhất được liên kết disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền chuỗi nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó ba miền hằng định (CH1, CH2, và CH3), nhờ đó vùng bản lề nằm giữa miền hằng định thứ nhất và miền hằng định thứ hai. Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền chuỗi nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó miền chuỗi nhẹ hằng định (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể là một trong hai loại, được gọi là kapa (κ) và lambda (λ), dựa trên trình tự axit amin của miền hằng định của nó.

Thuật ngữ "tờ hướng dẫn sử dụng" được sử dụng để đề cập đến hướng dẫn thông thường được chứa trong bao gói thương mại của sản phẩm trị liệu, tờ hướng dẫn sử dụng này chứa thông tin về chỉ dẫn, cách sử dụng, liều lượng, việc dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu này.

"Phần trăm (%) độ đồng nhất trình tự axit amin" so với trình tự polypeptit tham chiếu được định nghĩa là phần trăm các gốc axit amin trong trình tự đang quan tâm mà giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi sắp hàng các trình tự này và đưa các khoảng trống vào, nếu cần, để đạt được phần trăm độ đồng nhất trình tự tối đa, và không coi bất kỳ sự thay thế bảo toàn nào là một phần của độ đồng nhất trình tự. Việc sắp hàng nhằm mục đích xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được bằng nhiều cách mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính công bố công khai như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực có thể xác định các thông số thích hợp để sắp hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được sự sắp hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự đang được so sánh. Tuy nhiên, đối với các mục đích trong bản mô tả này, giá trị % độ đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp với tài liệu hướng dẫn sử dụng tại Cục bản quyền tác giả Hoa Kỳ (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, được đăng ký tại đó với số đăng ký bản quyền Hoa Kỳ là

TXU510087. Chương trình ALIGN-2 được công bố công khai bởi Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên soạn từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 cần được biên soạn để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D số hóa. Tất cả các thông số so sánh trình tự đều được đặt bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong trường hợp ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, % độ đồng nhất trình tự axit amin của trình tự axit amin A đã cho với, đối với hoặc so với trình tự axit amin B đã cho (có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự axit amin A đã cho có hoặc chứa % độ đồng nhất trình tự axit amin cụ thể với, đối với hoặc so với trình tự axit amin B đã cho) được tính như sau:

$$100 \text{ lần của phân số } X/Y$$

trong đó X là số lượng gốc axit amin được chấm điểm là các ghép cặp giống nhau bởi chương trình sắp hàng trình tự ALIGN-2 trong bước sắp hàng A và B bằng chương trình đó, và trong đó Y là tổng số lượng gốc axit amin trong B. Cần phải hiểu rằng khi chiều dài của trình tự axit amin A không bằng với chiều dài của trình tự axit amin B, thì % độ đồng nhất trình tự axit amin của A so với B sẽ không bằng với % độ đồng nhất trình tự axit amin của B so với A. Trừ khi có quy định cụ thể khác, tất cả các giá trị % độ đồng nhất trình tự axit amin được sử dụng trong bản mô tả này được thu nhận như được mô tả trong đoạn ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình máy tính ALIGN-2.

Thuật ngữ “dược phẩm” dùng để chỉ chế phẩm ở dạng cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính chứa trong đó có tác dụng, và không chứa các thành phần bổ sung mà độc không thể chấp nhận được đối với đối tượng sử dụng chế phẩm này.

“Chất mang dược dụng” dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, mà không độc đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

Thuật ngữ “CD19”, như được sử dụng trong bản mô tả này, đề cập đến CD19 kháng nguyên tế bào lympho B ở người ((các) tên thay thế: kháng nguyên biệt hóa CD19, kháng nguyên bề mặt tế bào lympho B B4, kháng nguyên bề mặt tế bào T Leu-12; UniProtKB P15391-1 (isoform 1; SEQ ID NO: 33) và P15391-2 (isoform 2; SEQ ID NO: 34)). Thuật ngữ này bao gồm CD19 ở người chưa được xử lý có “chiều dài đầy đủ”

cũng như dạng bất kỳ của CD19 ở người thu được từ việc xử lý trong tế bào miễn là kháng thể như được nêu trong bản mô tả này liên kết với nó.

Trong bản mô tả này, “điều trị” (và các biến thể ngữ pháp của nó như “sự điều trị” hoặc “việc điều trị”) dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng nhằm nỗ lực làm thay đổi quá trình tự nhiên của cá thể được điều trị, và có thể được thực hiện để phòng bệnh hoặc trong quá trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng mong muốn của việc điều trị bao gồm, nhưng không giới hạn ở, ngăn ngừa sự xuất hiện hoặc tái phát của bệnh, thuyên giảm các triệu chứng, giảm bớt các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn ngừa sự di căn, giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc giảm nhẹ trạng thái bệnh, và thuyên giảm hoặc cải thiện tiên lượng. Theo một số phương án, kháng thể nêu trong bản mô tả này được sử dụng để làm chậm sự phát triển của bệnh hoặc làm chậm sự tiến triển của bệnh.

Thuật ngữ “vùng biến đổi” hoặc “miền biến đổi” dùng để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà liên quan đến việc gắn kết kháng thể vào kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (VH và VL, một cách tương ứng) của kháng thể nguyên gốc thường có cấu trúc tương tự, trong đó mỗi miền chứa bốn vùng khung (FR) bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR). (Xem, ví dụ, tài liệu Kindt, T.J. et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., N.Y. (2007), trang 91). Miền VH hoặc VL đơn lẻ có thể là đủ để mang lại tính đặc hiệu gắn kết kháng nguyên. Ngoài ra, kháng thể mà gắn kết vào kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể mà gắn kết vào kháng nguyên để sàng lọc thư viện miền VL hoặc VH bổ sung, một cách tương ứng. Xem, ví dụ, Portolano, S. et al., *J. Immunol.* 150 (1993) 880-887; Clackson, T. et al., *Nature* 352 (1991) 624-628.

Thuật ngữ “vector”, trong bản mô tả này, dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân giống axit nucleic khác mà nó được liên kết vào đó. Thuật ngữ này bao gồm vector là cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vector được tích hợp vào hệ gen của tế bào chủ mà nó được đưa vào đó. Một số vector cụ thể có khả năng điều khiển sự biểu

hiện của axit nucleic mà nó được liên kết theo cách có thể kiểm soát vào đó. Các vectơ như vậy trong bản mô tả này được gọi là “vectơ biểu hiện”.

II. CHẾ PHẨM VÀ PHƯƠNG PHÁP

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa một phần vào việc phát hiện ra rằng để loại bỏ các điểm khử nhiều amin trong kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người thì một đột biến duy nhất là đủ. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến các kháng thể liên kết CD19 ở người. Các kháng thể như được nêu trong bản mô tả này là hữu ích, ví dụ, để chẩn đoán hoặc điều trị.

A. Các kháng thể kháng CD19 ở người tiêu biểu

Phát hiện ra rằng kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người kiểu đại có ba điểm khử amit trong HVR-L1: NSNGNT (SEQ ID NO: 36). Ngoài ra, phát hiện ra là trong HVR-H2 có một điểm khử amit khác: KFNG (SEQ ID NO: 37).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được làm giống người được phân lập mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người và có độ ổn định được cải thiện, cụ thể độ ổn định khử amit trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ HVR HVR-H2 và HVR-L1, so với các biến thể được làm giống người khác. Trong kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người được cải thiện này, khả năng phản ứng chéo ở người/khỉ cynomolgus của kháng thể chuột bố mẹ được giữ lại.

Để giải quyết điểm khử amit trong HVR-H2 đột biến điểm từ N (Asn) đến Q (Gln) ở vị trí 64 (đánh số theo Kabat) được đưa vào. Do đó, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có HVR-H2 chứa trình tự axit amin TEKFGQ (SEQ ID NO: 38). Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người có HVR-H2 chứa trình tự axit amin YINPYNDGSK YTEKFGQ (SEQ ID NO: 11).

Để giải quyết điểm khử amit trong chuỗi nhẹ và để thu được kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người có độ ổn định sự khử amit cải thiện, các đột biến riêng lẻ ở vị trí Kabat 27d, 27e, 28 và 29 và đột biến kép ở các vị trí 27e và 28 (đánh số theo Kabat) được đưa vào. Tổng số 9 biến thể (từ biến thể 1 đến biến thể 9; SEQ ID NO: 60 đến 68 và 70) của kháng thể được làm giống người kiểu đại (biến thể 0; SEQ ID NO: 59 và 69) được tạo ra.

Vị trí Kabat

2222

Vị trí Kabat

6

7789

4

LC:

de

HC:

biến thể 0:wt

QSELSNGNTYL

TEKFNGKATL

biến thể 1:N27dH

QSEHNSNGNTYL

TEKFQGRVTM

biến thể 2:N27dQ

QSEQNSNGNTYL

TEKFQGRVTM

biến thể 3:S27eA

QSELANGNTYL

TEKFQGRVTM

biến thể 4:S27eV

QSENVNGNTYL

TEKFQGRVTM

biến thể 5:S27eP

QSENPNGNTYL

TEKFQGRVTM

biến thể 6:N28Q

QSELSQNGNTYL

TEKFQGRVTM

biến thể 7:G29A

QSELSNANTYL

TEKFQGRVTM

biến thể 8:G29V

QSELSNVNTYL

TEKFQGRVTM

biến thể 9:S27eP/N28S

QSENPNGNTYL

TEKFQGRVTM

biến thể →	0	1	2	3	4	5	6	7	8	9
↓thông số										
K _D (BIAcore) [nM]	5	250	136	2	1	6	54	4	16	45
t _{1/2} [phút]	-	0,1	1,1	105,2	191,5	43,6	4,4	51,5	17,6	4
Liên kết CD19 ở người sau khi ủ ở độ pH=7,4 [%]	46	0	75	84	85	95	91	72	83	83
Liên kết CD19 ở người sau khi ủ ở độ pH=6,0 [%]	90	0	95	95	97	99	97	86	91	87
Đỉnh chính SEC sau khi ủ [%]	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	> 95	-

Đã phát hiện ra rằng với một đột biến duy nhất ở vị trí 27e theo Kabat từ S (serin) đến P (prolin), tất cả điểm khử amit trong HVR-L1 có thể được giải quyết. Đây là đột biến không phải của gốc N dễ bị khử amit (asparagin) mà của gốc bên cạnh.

Do đó, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có HVR-L1 chứa trình tự axit amin LENPNGNT (SEQ ID NO: 39). Theo một phương án, kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người chứa HVR-L1 có trình tự axit amin LENPSGNT (SEQ ID NO: 40). Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người chứa HVR-L1 có trình tự axit amin RSSQSLENPN GNTYLN (SEQ ID NO: 20). Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người chứa HVR-L1 có trình tự axit amin RSSQSLENPS GNTYLN (SEQ ID NO: 28).

Ngoài ra, các kháng thể này duy trì khả năng phản ứng chéo với CD19 của khi cynomolgus như được thể hiện trong bảng dưới đây.

EC50 [μg/ml]	Biến thể 0	Biến thể 5	Biến thể 9
huCD19 ECD	0,087	0,084	0,089
cyCD19 ECD	0,313	0,255	0,435

Do đó, theo một phương án, kháng thể kháng CD19 ở người tính đặc hiệu liên kết với CD19 ở người và CD19 ở khi cynomolgus.

Kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người kiểu dại (biến thể 0) sau khi tinh chế thể hiện sự khử amit khoảng 7,5%. Sau khi bảo quản hai tuần ở độ pH 7,4 lượng kháng thể được khử amit tăng đến khoảng 18,5%. Kháng thể biến thể có đột biến S27eP (biến thể 5) thể hiện khử amit khoảng 2% và tạo thành suxinimit 2% sau khi tinh chế. Trong quá trình bảo quản ở độ pH 7,4 trong hai tuần chỉ có khoảng 7,5% kháng thể đã khử amit.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể được làm giống người được phân lập mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người và CD19 ở khi cynomolgus có HVR-H2 của SEQ ID NO: 11 và HVR-L1 của SEQ ID NO: 20 hoặc 28.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người có ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người có ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người có ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05. Theo một phương án, kháng thể có HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05. Theo phương án khác, kháng thể có HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05 và HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08. Theo phương án khác, kháng thể có HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05, HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08, và HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11. Theo phương án khác, kháng thể có (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể có ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08. Theo một phương án, kháng thể chứa (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể có ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08. Theo một phương án, kháng thể có (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có (a) vùng VH chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 05, và (b) vùng VL có ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có (a) vùng VH chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự VH HVR được chọn từ (i) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (ii) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11 và (iii) HVR-H3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 05, và (b) vùng VL chứa ít nhất một, ít nhất hai, hoặc tất cả ba trình tự VL HVR được chọn từ (i) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, (ii) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể có (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 08.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể có (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05, (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 28, (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin được chọn từ SEQ ID NO: 08.

Kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể được làm giống người. Theo một phương án, kháng thể kháng CD19 ở người được làm giống người có các HVR theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên, và còn chứa khung làm việc của thể nhận ở người, ví dụ khung làm việc globulin miễn dịch ở người (dòng mầm) hoặc khung làm việc liên ứng ở người.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng CD19 ở người có trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 09. Theo các phương án nhất định, trình tự VH có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa sự thay thế (ví dụ, thay thế bảo toàn), chèn, hoặc khuyết so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng CD19 ở người có trình tự còn khả năng liên kết với CD19 ở người. Theo các phương án nhất định, tổng số từ 1 đến 10 axit amin được thế, được chèn và/hoặc bị khuyết trong SEQ ID NO: 09. Theo các phương án nhất định, sự thay thế, chèn, hoặc mất xảy ra trong vùng ngoài vùng HVR (nghĩa là, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng CD19 ở người chứa trình tự VH trong SEQ ID NO: 09, bao gồm sự cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, VH có một, hai hoặc ba HVR được chọn từ: (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11, và (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể kháng CD19 ở người được mô tả, trong đó kháng thể này chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 27 (SEQ ID NO: 19 và SEQ ID NO: 27 khác ở một vị trí axit amin duy nhất). Theo các phương án nhất định, trình tự VL có độ tương đồng trình tự ít nhất 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa sự thay thế (ví dụ, thay thế bảo toàn), chèn, hoặc khuyết so với trình tự tham chiếu, nhưng kháng thể kháng CD19 ở người có trình tự còn khả năng liên kết với CD19 ở người. Theo các phương án nhất định, tổng số 1 đến 10 axit amin được thế, được chèn và/hoặc bị khuyết trong SEQ ID NO: 19 hoặc SEQ ID NO: 27. Theo các phương án nhất định, sự thay thế, chèn, hoặc mất xảy ra trong vùng ngoài vùng HVR (nghĩa là, trong các FR). Tùy ý, kháng thể kháng CD19 ở người có các trình tự VL trong SEQ ID NO: 19, bao gồm sự cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Tùy ý, kháng thể kháng CD19 ở người có trình tự VL trong SEQ ID NO: 27, bao gồm sự cải biến sau dịch mã của trình tự đó. Theo phương án cụ thể, VL có một, hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20, (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08. Theo phương án cụ thể, VL có một, hai hoặc ba HVR được chọn từ (a) HVR-L1 chứa trình tự

axit amin của SEQ ID NO: 28, (b) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và (c) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người, trong đó kháng thể này có VH như theo phương án bất kỳ nêu trên, và VL như theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên. Theo một phương án, kháng thể có trình tự VH và VL trong SEQ ID NO: 09 và SEQ ID NO: 19 hoặc 27, tương ứng, bao gồm cải biến sau dịch mã của các trình tự này.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể liên kết với epitop giống như kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, theo các phương án nhất định, kháng thể mà liên kết với epitop giống như kháng thể kháng CD19 ở người có trình tự VH của SEQ ID NO: 09 và trình tự VL của SEQ ID NO: 19.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD19 ở người theo phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên là kháng thể đơn dòng. Theo một phương án, kháng thể kháng CD19 ở người là mảnh kháng thể, ví dụ, Fv, Fab, Fab', scFv, kháng thể thể đôi, hoặc mảnh F(ab')₂. Theo phương án khác, kháng thể này là kháng thể có chiều dài đầy đủ, ví dụ, kháng thể IgG1 hoặc IgG 4 nguyên vẹn hoặc lớp kháng thể khác hoặc isotyp như được xác định trong bản mô tả này.

Theo một phương án của tất cả các khía cạnh, kháng thể này có (tất cả vị trí theo chỉ số EU của Kabat)

i) vùng Fc đồng dime của phân lớp IgG1 ở người tùy ý có các đột biến P329G, L234A và L235A, hoặc

ii) vùng Fc đồng dime của phân lớp IgG4 ở người tùy ý có các đột biến P329G, S228P và L235E, hoặc

iii) vùng Fc đồng dime của phân lớp IgG1 ở người có các đột biến (P329G, L234A, L235A) I253A, H310A, và H435A, hoặc có các đột biến (P329G, L234A, L235A) H310A, H433A, và Y436A, hoặc

iv) vùng Fc dị dime ở đó

a) một polypeptit vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc

b) một polypeptit vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc

c) một polypeptit vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C,

hoặc

v) vùng Fc dị dime của phân lớp IgG1 ở người ở đó cả hai polypeptit vùng Fc có các đột biến P329G, L234A và L235A, và

a) một polypeptit vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc

b) một polypeptit vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc

c) một polypeptit vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C,

hoặc

vi) vùng Fc dị dime của phân lớp IgG4 ở người ở đó cả hai polypeptit vùng Fc có các đột biến P329G, S228P và L235E và

a) một polypeptit vùng Fc chứa đột biến T366W, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A và Y407V, hoặc

b) một polypeptit vùng Fc chứa các đột biến T366W và Y349C, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A, Y407V, và S354C, hoặc

c) một polypeptit vùng Fc chứa các đột biến T366W và S354C, và polypeptit vùng Fc khác có các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C,

hoặc

vii) kết hợp một trong số iii) với một trong số vi), v) và vi).

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép, hai hóa trị có:

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế lẫn nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Kháng thể ở a) không chứa cải biến như được báo cáo ở b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở a) là các chuỗi được phân tách.

Trong kháng thể ở b)

trong chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ biến đổi VL được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH của kháng thể này,

và

trong chuỗi nặng

miền chuỗi nặng biến đổi VH được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL của kháng thể này.

Theo một phương án,

i) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất ở a) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo Kabat) được thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất ở a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo chỉ số Kabat EU) được thế bằng axit amin tích điện âm,

hoặc

ii) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ hai ở b) axit amin ở vị trí 124 (đánh số theo Kabat) được thế bằng axit amin tích điện dương, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ hai ở b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 (đánh số theo chỉ số Kabat EU) được thế bằng axit amin tích điện âm.

Theo một phương án được ưu tiên,

i) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất ở a) axit amin ở vị trí 124 được thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên, độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong

miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất ở a) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

hoặc

ii) trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ hai ở b) axit amin ở vị trí 124 được thế độc lập bằng lysin (K), arginin (R) hoặc histidin (H) (đánh số theo Kabat) (theo một phương án được ưu tiên, độc lập bằng lysin (K) hoặc arginin (R)), và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ hai ở b) axit amin ở vị trí 147 hoặc axit amin ở vị trí 213 được thế độc lập bằng axit glutamic (E) hoặc axit aspartic (D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, trong miền hằng định CL của chuỗi nặng thứ hai axit amin ở vị trí 124 và 123 được thế bằng K (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, trong miền hằng định CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai axit amin ở vị trí 147 và 213 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Theo một phương án được ưu tiên, trong miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất, axit amin ở vị trí 124 và 123 lần lượt được thế bằng R và K, và trong miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, trong miền hằng định CL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 124 và 123 được thế bằng K, và trong đó trong miền hằng định CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin ở vị trí 147 và 213 được thế bằng E, và trong miền biến đổi VL của chuỗi nhẹ thứ nhất, axit amin ở vị trí 38 được thế bằng K, trong miền biến đổi VH của chuỗi nặng thứ nhất, axit amin ở vị trí 39 được thế bằng E, trong vùng biến đổi VL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin ở vị trí 38 được thế bằng K, và trong miền biến đổi VH của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin ở vị trí 39 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép, hai hóa trị có

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai thay thế lẫn nhau, và trong đó miền hằng định CL và CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai được thay thế lẫn nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Kháng thể ở a) không chứa cải biến như được báo cáo ở b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở a) là các chuỗi được phân tách.

Trong kháng thể ở b)

trong chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ biến đổi VL được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH của kháng thể này, và miền chuỗi nhẹ hằng định CL được thay thế bằng miền chuỗi nặng hằng định CH1 của kháng thể này;

và

trong chuỗi nặng

miền chuỗi nặng biến đổi VH được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL của kháng thể này, và miền chuỗi nặng hằng định CH1 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ hằng định CL của kháng thể này.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép, hai hóa trị có

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền hằng định CL và CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai thay thế lẫn nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Kháng thể ở a) không có cải biến như được báo cáo ở b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở a) là các chuỗi được phân tách.

Trong kháng thể ở b)

trong chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ hằng định CL được thay thế bằng miền chuỗi nặng hằng định CH1 của kháng thể này;

và trong chuỗi nặng

miền chuỗi nặng hằng định CH1 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ hằng định CL của kháng thể này.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đa đặc hiệu bao gồm

a) kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể, và

b) một, hai, ba hoặc bốn mảnh Fab chuỗi đơn tính đặc hiệu liên kết với một đến bốn kháng nguyên khác (nghĩa là kháng nguyên thứ hai và/hoặc thứ ba và/hoặc thứ tư và/hoặc thứ năm, tốt hơn là tính đặc hiệu liên kết với một kháng nguyên khác, nghĩa là kháng nguyên thứ hai),

trong đó các mảnh Fab chuỗi đơn ở b) được dung hợp với kháng thể có chiều dài đầy đủ ở a) nhờ nhóm liên kết peptit ở đầu tận C hoặc N của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc một trong các kháng nguyên này là CD19 ở người.

Theo một phương án, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn tương đồng liên kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có chiều dài đầy đủ nhờ nhóm liên kết peptit ở đầu tận C của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Theo một phương án, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn tương đồng liên kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có chiều dài đầy đủ nhờ nhóm liên kết peptit ở đầu tận C của chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Theo một phương án, một hoặc hai mảnh Fab chuỗi đơn tương đồng liên kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có chiều dài đầy đủ nhờ nhóm liên kết peptit ở đầu tận C của chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Theo một phương án, hai mảnh Fab chuỗi đơn tương đồng liên kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có chiều dài đầy đủ nhờ nhóm liên kết peptit ở đầu tận C của mỗi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Theo một phương án, hai mảnh Fab chuỗi đơn tương đồng liên kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có chiều dài đầy đủ nhờ nhóm liên kết peptit ở đầu tận C của mỗi chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Theo một phương án, hai mảnh Fab chuỗi đơn tương đồng liên kết với kháng nguyên thứ hai được dung hợp với kháng thể có chiều dài đầy đủ nhờ nhóm liên kết peptit ở đầu tận C của mỗi chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép, ba hóa trị bao gồm:

a) kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể,

b) polypeptit thứ nhất bao gồm

ba) miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH),

hoặc

bb) miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) và miền hằng định của kháng thể 1 (CH1),

trong đó polypeptit thứ nhất được dung hợp với đầu tận N của miền VH của nó nhờ nhóm liên kết peptit với đầu tận C của một trong hai chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ,

c) polypeptit thứ hai có

ca) miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL),

hoặc

cb) miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) và miền hằng định chuỗi nhẹ của kháng thể (CL),

trong đó polypeptit thứ hai được dung hợp với đầu tận N của vùng VL nhờ nhóm liên kết peptit với đầu tận C của vùng còn lại trong số hai chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ,

và

trong đó miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) của polypeptit thứ nhất và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) của polypeptit thứ hai cùng nhau tạo ra vị trí liên kết kháng nguyên tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai,

và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Theo một phương án, miền biến đổi chuỗi nặng của kháng thể (VH) của polypeptit ở b) và miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể (VL) của polypeptit ở c) được liên kết và được làm ổn định nhờ cầu disulfua ở giữa chuỗi bằng cách đưa liên kết disulfua vào giữa các vị trí sau:

- i) từ vị trí 44 miền biến đổi chuỗi nặng đến vị trí 100 miền biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc
- ii) từ vị trí 105 miền biến đổi chuỗi nặng đến vị trí 43 miền biến đổi chuỗi nhẹ, hoặc
- iii) từ vị trí 101 miền biến đổi chuỗi nặng đến vị trí 100 miền biến đổi chuỗi nhẹ (đánh số luôn theo chỉ số Kabat EU).

Các kỹ thuật để đưa cầu disulfua không tự nhiên vào để làm ổn định như được mô tả ví dụ trong WO 94/029350, Rajagopal, V., và các đồng tác giả, Prot. Eng. (1997) 1453-59; Kobayashi, H., và các đồng tác giả, Nuclear Medicine & Biology, Vol. 25, (1998) 387-393; hoặc Schmidt, M., và các đồng tác giả, Oncogene (1999) 18 1711-1721. Theo một phương án, liên kết disulfua tùy ý giữa miền biến đổi của polypeptit ở b) và c) là ở giữa vị trí 44 miền biến đổi chuỗi nặng và vị trí 100 miền biến đổi chuỗi nhẹ. Theo một phương án, liên kết disulfua tùy ý giữa miền biến đổi của các polypeptit ở b) và c) là ở giữa vị trí 105 miền biến đổi chuỗi nặng và vị trí 43 miền biến đổi chuỗi nhẹ (đánh số luôn theo Kabat). Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép, ba hóa trị không có sự ổn định disulfua tùy ý giữa miền biến đổi VH và VL của các mảnh Fab chuỗi đơn được ưu tiên.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu, có

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nhẹ thứ hai (được cải biến) và chuỗi nặng thứ hai (được cải biến) của kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai, trong đó miền biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau, và/hoặc trong đó miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau, và

c) trong đó một đến bốn peptit liên kết kháng nguyên tính đặc hiệu liên kết với một hoặc hai kháng nguyên khác (nghĩa là với kháng nguyên thứ ba và/hoặc thứ tư) được dung hợp nhờ nhóm liên kết peptit với đầu tận C hoặc N của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng ở a) và/hoặc b),

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai hoặc một trong số các kháng nguyên này còn là CD19 ở người.

Kháng thể ở a) không có cải biến như được báo cáo ở b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ ở a) là các chuỗi được phân tách.

Theo một phương án, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu có c) một hoặc hai peptit liên kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với một hoặc hai kháng nguyên khác.

Theo một phương án, các peptit liên kết kháng nguyên được chọn từ nhóm mảnh scFv và mảnh scFab.

Theo một phương án, các peptit liên kết kháng nguyên là các mảnh scFv.

Theo một phương án, các peptit liên kết kháng nguyên là các mảnh scFab.

Theo một phương án, các peptit liên kết kháng nguyên được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng ở a) và/hoặc b).

Theo một phương án, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu có c) một hoặc hai peptit liên kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với một kháng nguyên khác.

Theo một phương án, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu có c) hai peptit liên kết kháng nguyên giống hệt nhau mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ ba.

Theo một phương án được ưu tiên, hai peptit liên kết kháng nguyên giống hệt nhau này cả hai được dung hợp thông qua nhóm liên kết peptit giống nhau với đầu tận C của chuỗi nặng của a) và b). Theo một phương án được ưu tiên, hai peptit liên kết kháng nguyên giống hệt nhau là mảnh scFv hoặc mảnh scFab.

Theo một phương án, kháng thể ba đặc hiệu hoặc bốn đặc hiệu có c) hai peptit liên kết kháng nguyên mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ ba và thứ tư. Theo một phương án, hai peptit liên kết kháng nguyên cả hai được dung hợp thông qua đầu nối peptit giống với đầu tận C của chuỗi nặng ở a) và b). Theo một phương án được ưu tiên, hai peptit liên kết kháng nguyên là mảnh scFv hoặc mảnh scFab.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể hóa trị bốn, đặc hiệu kép bao gồm

a) hai chuỗi nhẹ và hai chuỗi nặng của kháng thể, mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất (và bao gồm hai mảnh Fab),

b) hai mảnh Fab khác của kháng thể, mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó các mảnh Fab khác cả hai được dung hợp thông qua nhóm liên kết peptit với đầu tận C hoặc N của chuỗi nặng ở a),

và

trong đó trong các mảnh Fab, các cải biến dưới đây được thực hiện

i) trong cả hai mảnh Fab ở a), hoặc trong cả hai mảnh Fab của b), miền biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau, và/hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau,

hoặc

ii) trong cả hai mảnh Fab ở a) vùng biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau, và miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau,

và

trong cả hai mảnh Fab của b) vùng biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau, hoặc vùng hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau,

hoặc

iii) trong cả hai mảnh Fab ở a) vùng biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau, hoặc miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau,

và

trong cả hai mảnh Fab ở b) miền biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau, và miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau,

hoặc

iv) trong cả hai mảnh Fab ở a) miền biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau, và trong cả hai mảnh Fab của b) miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau,

hoặc

v) trong cả hai mảnh Fab ở a) miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau, và trong cả hai mảnh Fab ở b) miền biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Theo một phương án, các mảnh Fab khác cả hai được dung hợp thông qua nhóm liên kết peptit với các đầu tận C của chuỗi nặng ở a), hoặc với các đầu tận N của chuỗi nặng ở a).

Theo một phương án, các mảnh Fab khác cả hai được dung hợp thông qua nhóm liên kết peptit với đầu tận C của chuỗi nặng ở a).

Theo một phương án, các mảnh Fab khác cả hai được dung hợp thông qua đầu nối peptit với đầu tận N của chuỗi nặng ở a).

Theo một phương án, các mảnh Fab cải biến dưới đây được thực hiện:

i) trong cả hai mảnh Fab ở a), hoặc trong cả hai mảnh Fab ở b), miền biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau,

và/hoặc

miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau.

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến dưới đây được thực hiện:

- i) trong cả hai mảnh Fab ở a) miền biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau,

và/hoặc

miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau.

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến dưới đây được thực hiện:

- i) trong cả hai mảnh Fab ở a) miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau.

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến dưới đây được thực hiện:

- i) trong cả hai mảnh Fab ở b) miền biến đổi VL và VH được thay thế lẫn nhau,

và/hoặc

miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau.

Theo một phương án, trong các mảnh Fab, các cải biến dưới đây được thực hiện:

- i) trong cả hai mảnh Fab ở b) miền hằng định CL và CH1 được thay thế lẫn nhau.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể hóa trị bốn, đặc hiệu kép bao gồm:

a) chuỗi nặng (được cải biến) của kháng thể thứ nhất, mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất và có cặp miền VH-CH1 thứ nhất, trong đó với đầu tận C của chuỗi nặng đã nêu, đầu tận N của cặp miền VH-CH1 thứ hai của kháng thể thứ nhất được dung hợp nhờ nhóm liên kết peptit,

b) hai chuỗi nhẹ của kháng thể thứ nhất ở a),

c) chuỗi nặng (được cải biến) của kháng thể thể đôi, mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai và bao gồm cặp miền VH-CL thứ nhất, trong đó với đầu tận C của chuỗi nặng đã nêu, đầu tận N của cặp miền VH-CL thứ hai của kháng thể thứ hai được dung hợp nhờ nhóm liên kết peptit, và

d) hai chuỗi nhẹ (được cải biến) của kháng thể thể đôi ở c), mỗi chuỗi có cặp miền CL-CH1,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm:

a) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể thứ nhất có chiều dài đầy đủ mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và

b) chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể thứ hai có chiều dài đầy đủ mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó đầu tận N của chuỗi nặng được nối với đầu tận C của chuỗi nhẹ nhờ nhóm liên kết peptit,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Kháng thể ở a) không có cải biến như được báo cáo ở b) và chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là các chuỗi được phân tách.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

a) kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể, và

b) mảnh Fv tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai có miền VH^2 và miền VL^2 , trong đó cả hai miền được nối với nhau nhờ cầu disulfua,

trong đó chỉ miền VH^2 hoặc miền VL^2 được dung hợp nhờ nhóm liên kết peptit với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất,

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Trong chuỗi nặng và chuỗi nhẹ đặc hiệu kép ở a) là các chuỗi được phân tách.

Theo một phương án, kháng thể còn lại của miền VH^2 hoặc miền VL^2 không được dung hợp nhờ nhóm liên kết peptit với chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất.

Theo tất cả khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, chuỗi nhẹ thứ nhất có miền VL và miền CL và chuỗi nặng thứ nhất có miền VH, miền CH1, vùng bản lề, miền CH2 và miền CH3.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể ba hóa trị đặc hiệu kép bao gồm

- a) hai mảnh Fab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất,
- b) một mảnh CrossFab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai trong đó miền CH1 và CL được trao đổi với nhau,
- c) một vùng Fc chứa vùng chuỗi nặng Fc thứ nhất và vùng chuỗi nặng Fc thứ hai,

trong đó đầu tận C của miền CH1 của hai mảnh Fab được nối với đầu tận N của polypeptit vùng Fc chuỗi nặng, và

trong đó đầu tận C của miền CL của mảnh CrossFab được nối với đầu tận N của miền VH của một trong các mảnh Fab, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể ba hóa trị đặc hiệu kép chứa

- a) mảnh Fab thứ nhất và thứ hai mà mỗi mảnh tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất,
- b) một mảnh CrossFab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai trong đó miền CH1 và CL được trao đổi cho nhau,
- c) một vùng Fc chứa vùng chuỗi nặng Fc thứ nhất và vùng chuỗi nặng Fc thứ hai,

trong đó đầu tận C của miền CH1 của mảnh Fab thứ nhất được nối với đầu tận N của một trong số các polypeptit vùng Fc chuỗi nặng và đầu tận C của miền CL của mảnh CrossFab được nối với đầu tận N của polypeptit vùng Fc chuỗi nặng còn lại, và

trong đó đầu tận C của miền CH1 của mảnh Fab thứ hai được nối với đầu tận N của miền VH của mảnh Fab thứ nhất hoặc với đầu tận N của miền VH của mảnh CrossFab, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể ba hóa trị đặc hiệu kép bao gồm

- a) mảnh Fab thứ nhất và thứ hai mà mỗi mảnh tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất,
- b) một mảnh CrossFab mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai trong đó miền VH và VL được trao đổi cho nhau,
- c) một vùng Fc chứa vùng chuỗi nặng Fc thứ nhất và vùng chuỗi nặng Fc thứ hai,

trong đó đầu tận C của miền CH1 của mảnh Fab thứ nhất được nối với đầu tận N của một trong số các polypeptit vùng Fc chuỗi nặng và đầu tận C của miền CH1 của mảnh CrossFab được nối với đầu tận N của polypeptit vùng Fc chuỗi nặng còn lại, và

trong đó đầu tận C của miền CH1 của mảnh Fab thứ hai được nối với đầu tận N của miền VH của mảnh Fab thứ nhất hoặc với đầu tận N của miền VL của mảnh CrossFab, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

- a) kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể, và

- b) mảnh Fab tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai có miền VH² và miền VL² chứa mảnh chuỗi nặng và mảnh chuỗi nhẹ, trong đó

trong mảnh chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ biến đổi VL² được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH² của kháng thể này,

và

trong mảnh chuỗi nặng

miền chuỗi nặng biến đổi VH² được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL² của kháng thể này

trong đó mảnh Fab chuỗi nặng được chèn vào giữa miền CH1 của một trong số chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ và vùng Fc tương ứng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, và đầu tận N của mảnh Fab chuỗi nhẹ được liên hợp với đầu tận C của chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ mà cặp với chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ vào mảnh Fab chuỗi nặng được chèn vào, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Một khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép bao gồm

a) kháng thể có chiều dài đầy đủ tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ nhất và bao gồm hai chuỗi nặng của kháng thể và hai chuỗi nhẹ của kháng thể, và

b) mảnh Fab tính đặc hiệu liên kết với kháng nguyên thứ hai có miền VH^2 và miền VL^2 chứa mảnh chuỗi nặng và mảnh chuỗi nhẹ, trong đó

trong mảnh chuỗi nhẹ

miền chuỗi nhẹ biến đổi VL^2 được thay thế bằng miền chuỗi nặng biến đổi VH^2 của kháng thể này,

và

trong mảnh chuỗi nặng

miền chuỗi nặng biến đổi VH^2 được thay thế bằng miền chuỗi nhẹ biến đổi VL^2 của kháng thể này

trong đó đầu tận C của mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab được liên hợp với đầu tận N của một trong số chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ và đầu tận C của mảnh chuỗi nhẹ của mảnh Fab được liên hợp với đầu tận N của chuỗi nhẹ của kháng thể có chiều dài đầy đủ mà cặp với chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ mà mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab được liên hợp với, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất hoặc kháng nguyên thứ hai là CD19 ở người.

Theo một phương án của tất cả các khía cạnh, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này là kháng thể đa đặc hiệu, mà yêu cầu sự dị dime hóa ít nhất hai polypeptit chuỗi nặng, và trong đó kháng thể này tính đặc hiệu liên kết với thụ thể transferrin ở người và kháng nguyên thụ thể transferrin thứ hai không phải ở người.

Nhiều phương pháp tiếp cận để cải biến CH3 để hỗ trợ sự dị dime hóa được mô tả, ví dụ trong WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954, WO 2013/096291, được đưa vào phần mô tả này bằng cách viện dẫn. Thông thường, trong các phương pháp tiếp cận đã biết trong lĩnh vực này, cả hai miền CH3 của chuỗi nặng thứ nhất và miền CH3 của chuỗi nặng thứ hai được thiết kế theo cách bổ sung sao cho chuỗi nặng này có một miền CH3 được thiết kế có thể không còn đồng dime hóa với một chuỗi nặng khác của cùng cấu trúc (ví dụ chuỗi nặng thứ nhất được thiết kế CH3 có thể không còn đồng dime hóa với một chuỗi nặng thứ nhất được thiết kế CH3 khác; và chuỗi nặng thứ hai được thiết kế CH3 có thể không còn đồng dime hóa với một chuỗi nặng thứ hai được thiết kế CH3 khác). Theo đó chuỗi nặng có một miền CH3 được thiết kế bị buộc phải dị dime hóa với một chuỗi nặng khác có miền CH3, được thiết kế theo cách bù. Đối với phương án này, miền CH3 của chuỗi nặng thứ nhất và miền CH3 của chuỗi nặng thứ hai được thiết kế theo cách bù bằng việc thế axit amin, sao cho chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai bị buộc phải dị dime hóa, trong đó chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai có thể không còn đồng dime hóa nữa (ví dụ vì lý do không gian).

Các phương pháp tiếp cận khác nhau để hỗ trợ sự dị dime hóa chuỗi nặng đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật, mà được trích dẫn và được bao gồm ở trên, được dự định làm các phương án thay thế khác nhau được sử dụng để tạo ra kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, mà chứa “vùng Fab không liên kết chéo” thu được từ kháng thể thứ nhất, mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất, và “vùng Fab chéo” thu được từ kháng thể thứ hai, mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, kết hợp với sự thế axit amin cụ thể được mô tả ở trên.

Các miền CH3 của kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này có thể được biến đổi bằng kỹ thuật “đóng nút vào lỗ (knob-into-hole)” được mô tả chi tiết với các ví dụ trong ví dụ WO 96/027011, Ridgway, J.B., và các đồng tác giả, Protein Eng. 9 (1996) 617-621; và Merchant, A.M., và các đồng tác giả, Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681. phương pháp này, bề mặt tương tác của hai miền CH3 được biến đổi để làm tăng sự dị dime hóa của cả hai chuỗi nặng chứa hai miền CH3 này. Một miền trong số hai miền CH3 (của hai chuỗi nặng) có thể là “nút”, trong khi miền còn lại là “lỗ”. Việc đưa cầu disulfua vào còn làm ổn định chất dị dime (Merchant, A.M., et al.,

Nature Biotech. 16 (1998) 677-681; Atwell, S., et al., J. Mol. Biol. 270 (1997) 26-35) và làm tăng sản lượng.

Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này chứa đột biến T366W trong miền CH3 của “chuỗi nút” và các đột biến T366S, L368A, Y407V trong miền CH3 của “chuỗi lỗ” (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Cầu disulfua liên chuỗi khác giữa các miền CH3 cũng có thể được sử dụng (Merchant, A.M., et al., Nature Biotech. 16 (1998) 677-681) ví dụ bằng cách đưa đột biến Y349C vào trong miền CH3 của “chuỗi nút” và đột biến E356C hoặc đột biến S354C vào trong miền CH3 của “chuỗi lỗ”. Do đó, theo một phương án được ưu tiên khác nữa, kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này có đột biến Y349C và T366W trong một miền trong số hai miền CH3 và các đột biến E356C, T366S, L368A và Y407V trong miền còn lại trong số hai miền CH3 hoặc kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này có các đột biến Y349C và T366W trong một trong số hai miền CH3 và các đột biến S354C, T366S, L368A và Y407V trong miền còn lại trong số hai miền CH3 (đột biến Y349C khác trong một miền CH3 và đột biến E356C hoặc S354C khác trong miền CH3 còn lại tạo ra cầu disulfua liên chuỗi) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Còn các kỹ thuật đóng nút vào lỗ khác như được mô tả bởi EP 1 870 459A1, có thể được sử dụng theo cách khác hoặc ngoài ra. Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này có các đột biến R409D và K370E trong miền CH3 của “chuỗi nút” và các đột biến D399K và E357K trong miền CH3 của “chuỗi lỗ” (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này có đột biến T366W trong miền CH3 của “chuỗi nút” và các đột biến T366S, L368A và Y407V trong miền CH3 của “chuỗi lỗ” và ngoài ra các đột biến R409D và K370E trong miền CH3 của “chuỗi nút” và các đột biến D399K và E357K trong miền CH3 của “chuỗi lỗ” (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án, kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này có các đột biến Y349C và T366W trong một trong số hai miền CH3 và các đột biến S354C, T366S, L368A và Y407V trong miền còn lại trong số hai miền CH3, hoặc kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này có các đột biến Y349C và T366W trong một trong số hai miền CH3 và các đột biến S354C, T366S, L368A và Y407V

trong miền còn lại trong số hai miền CH₃ và ngoài ra các đột biến R409D và K370E trong miền CH₃ của “chuỗi nút” và các đột biến D399K và E357K trong miền CH₃ của “chuỗi lỗ” (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Ngoài “công nghệ đóng nút vào lỗ”, các kỹ thuật khác để cải biến miền CH₃ của chuỗi nặng của kháng thể đa đặc hiệu để tăng cường sự dị dime hóa đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật. Các kỹ thuật này, được mô tả cụ thể trong WO 96/27011, WO 98/050431, EP 1870459, WO 2007/110205, WO 2007/147901, WO 2009/089004, WO 2010/129304, WO 2011/90754, WO 2011/143545, WO 2012/058768, WO 2013/157954 và WO 2013/096291 được dự định trong bản mô tả là các kỹ thuật thay thế “công nghệ đóng nút vào lỗ” kết hợp với kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này.

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, phương pháp này được mô tả trong EP 1870459 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Phương pháp này dựa vào việc đưa axit amin tích điện có điện tích trái dấu ở các vị trí axit amin cụ thể trong giao diện miền CH₃/CH₃ giữa cả hai chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai.

Ngoài ra, phương án này đề cập đến kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, trong đó trong cấu trúc bậc ba của kháng thể miền CH₃ của chuỗi nặng thứ nhất và miền CH₃ của chuỗi nặng thứ hai tạo ra giao diện nằm giữa các miền CH₃ kháng thể tương ứng, trong đó trình tự axit amin tương ứng của miền CH₃ của chuỗi nặng thứ nhất và miền CH₃ của chuỗi nặng thứ hai mỗi miền chứa một tập hợp axit amin nằm trong giao diện này trong cấu trúc bậc ba của kháng thể này, trong đó từ tập hợp axit amin nằm trong giao diện trong miền CH₃ của một chuỗi nặng, axit amin thứ nhất được thế bằng axit amin tích điện dương và từ tập hợp axit amin nằm trong giao diện trong miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại, axit amin thứ hai được thế bằng axit amin tích điện âm. Kháng thể đa đặc hiệu theo phương án này cũng được đề cập trong bản mô tả là “kháng thể đa đặc hiệu được thiết kế CH₃(+/-)” (trong đó ký hiệu “+/-” chỉ axit amin tích điện trái dấu mà được đưa vào miền CH₃ tương ứng).

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu được thiết kế CH3(+/-) như được nêu trong bản mô tả này axit amin tích điện dương được chọn từ K, R và H, và axit amin tích điện âm được chọn từ E hoặc D.

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu được thiết kế CH3(+/-) như được nêu trong bản mô tả này axit amin tích điện dương được chọn từ K và R, và axit amin tích điện âm được chọn từ E hoặc D.

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu được thiết kế CH3(+/-) như được nêu trong bản mô tả này axit amin tích điện dương là K, và axit amin tích điện âm là E.

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu được thiết kế CH3(+/-) như được nêu trong bản mô tả này trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin R ở vị trí 409 được thế bằng D và axit amin K ở vị trí được thế bằng E, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 399 được thế bằng K và axit amin E ở vị trí 357 được thế bằng K (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này phương pháp được mô tả trong WO 2013/157953 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng K và axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng K và axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng K, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Ngoài ra, ít nhất một trong số các thay thế dưới đây được bao gồm trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại: axit amin Y ở vị trí 349 được thế bằng E, axit amin Y ở vị trí 349 được thế bằng D và axit amin L ở vị trí 368 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án, axit amin L ở vị trí 368 được thế bằng E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này phương pháp được mô tả trong WO 2012/058768 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng Y và axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng A, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng A và axit amin K ở vị trí 409 được thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án khác, ngoài sự thay thế nêu trên, trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại ít nhất một trong số axit amin ở vị trí 411 (ban đầu là T), 399 (ban đầu là D), 400 (ban đầu là S), 405 (ban đầu là F), 390 (ban đầu là N) và 392 (ban đầu là K) được thế (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Thế được ưu tiên là:

- thế axit amin T ở vị trí 411 bằng axit amin được chọn từ N, R, Q, K, D, E và W (đánh số theo chỉ số Kabat EU),
- thế axit amin D ở vị trí 399 bằng axit amin được chọn từ R, W, Y, và K (đánh số theo chỉ số Kabat EU),
- thế axit amin S ở vị trí 400 bằng axit amin được chọn từ E, D, R và K (đánh số theo chỉ số Kabat EU),
- thế axit amin F ở vị trí 405 bằng axit amin được chọn từ I, M, T, S, V và W (đánh số theo chỉ số Kabat EU);
- thế axit amin N ở vị trí 390 bằng axit amin được chọn từ R, K và D (đánh số theo chỉ số Kabat EU); và
- thế axit amin K ở vị trí 392 bằng axit amin được chọn từ V, M, R, L, F và E (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo phương án khác về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này (được thiết kế theo WO 2012/058768), trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin L ở vị trí 351 được thế bằng Y và axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng A, và trong miền CH3 của chuỗi nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng V và axit amin K ở vị trí 409 được thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án khác của kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH3 của một chuỗi nặng, axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng A, và trong miền CH3 của chuỗi

nặng còn lại, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng A và axit amin K ở vị trí 409 được thế bằng F (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án cuối nêu trên, trong miền CH₃ của chuỗi nặng khác, axit amin K ở vị trí 392 được thế bằng E, axit amin T ở vị trí 411 được thế bằng E, axit amin D ở vị trí 399 được thế bằng R và axit amin S ở vị trí 400 được thế bằng R (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, phương pháp được mô tả trong WO 2011/143545 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu, như được nêu trong bản mô tả này, sự cải biến axit amin trong miền CH₃ của cả hai chuỗi nặng được đưa vào các vị trí 368 và/hoặc 409 (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này phương pháp được mô tả trong WO 2011/090762 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. WO 2011/090762 đề cập đến sự cải biến axit amin theo công nghệ “đóng nút vào lỗ”. Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu được thiết kế CH₃(KiH) như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH₃ của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng W, và trong miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại, axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng A (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo phương án khác về kháng thể đa đặc hiệu được thiết kế CH₃(KiH) như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH₃ của một chuỗi nặng, axit amin T ở vị trí 366 được thế bằng Y, và trong miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại, axit amin Y ở vị trí 407 được thế bằng T (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể này là loại isotyp IgG2, phương pháp này được mô tả trong WO 2011/090762 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu.

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, phương pháp được mô tả trong WO 2009/089004 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH₃ của một chuỗi nặng, axit amin K hoặc N ở vị trí 392 được thế bằng axit amin tích điện

âm (theo một phương án được ưu tiên, bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên, bằng D), và trong miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 399, axit amin E hoặc D ở vị trí 356 hoặc axit amin E ở vị trí 357 được thế bằng axit amin tích điện dương (theo một phương án được ưu tiên, K hoặc R, theo một phương án được ưu tiên, bằng K, theo một phương án được ưu tiên, axit amin ở vị trí 399 hoặc 356 được thế bằng K) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, ngoài sự thế nêu trên, trong miền CH₃ của một chuỗi nặng, axit amin K hoặc R ở vị trí 409 được thế bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án được ưu tiên, bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên, bằng D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác, ngoài ra hoặc theo cách khác đối với sự thế nêu trên, trong miền CH₃ của một chuỗi nặng, axit amin K ở vị trí 439 và/hoặc axit amin K ở vị trí 370 được thế độc lập cho nhau bằng axit amin tích điện âm (theo một phương án được ưu tiên, bằng E hoặc D, theo một phương án được ưu tiên, bằng D) (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, phương pháp được mô tả trong WO 2007/147901 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu. Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, trong miền CH₃ của một chuỗi nặng, axit amin K ở vị trí 253 được thế bằng E, axit amin D ở vị trí 282 được thế bằng K và axit amin K ở vị trí 322 được thế bằng D, và trong miền CH₃ của chuỗi nặng còn lại, axit amin D ở vị trí 239 được thế bằng K, axit amin E ở vị trí 240 được thế bằng K và axit amin K ở vị trí 292 được thế bằng D (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án về kháng thể đa đặc hiệu như được nêu trong bản mô tả này, phương pháp được mô tả trong WO 2007/110205 được sử dụng để hỗ trợ sự dị dime hóa của chuỗi nặng thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể đa đặc hiệu.

Theo một phương án về tất cả khía cạnh và các phương án như được nêu trong bản mô tả này kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đặc hiệu kép hoặc kháng thể đặc hiệu ba. Theo một phương án được ưu tiên, kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đặc hiệu kép.

Theo một phương án về tất cả khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể này là kháng thể hai hóa trị hoặc ba hóa trị. Theo một phương án, kháng thể này là kháng thể hai hóa trị.

Theo một phương án về tất cả khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu có cấu trúc miền hằng định của kháng thể typ IgG. Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là của phân lớp IgG1 của người, hoặc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A và L235A. Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là của phân lớp IgG2 của người. Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là của phân lớp IgG3 của người. Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là của phân lớp IgG4 của người hoặc, phân lớp IgG4 của người có đột biến S228P khác. Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là phân lớp IgG1 của người hoặc phân lớp IgG4 của người. Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A và L235A (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là của phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P và L235E (đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án khác của tất cả các khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể đa đặc hiệu được đặc trưng bởi kháng thể đa đặc hiệu là của phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G (đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Theo một phương án về tất cả khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể có chuỗi nặng chứa miền CH3 như được nêu trong bản mô tả này, có glyxin-lysin dipeptit đầu tận C khác (G446 và K447, đánh số theo chỉ số Kabat EU). Theo một phương án về tất cả khía cạnh như được nêu trong bản mô tả này, kháng thể có chuỗi nặng chứa miền CH3, như được nêu trong bản mô tả này, có gốc glyxin đầu tận C khác (G446, đánh số theo chỉ số Kabat EU).

Kháng thể như được nêu trong bản mô tả này là theo một phương án được đặc trưng bởi phân lớp IgG1 của người có các đột biến PVA236, L234A/L235A, và/hoặc GLPSS331 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat), hoặc của phân lớp IgG4. Theo phương án khác, kháng thể được đặc trưng bởi lớp IgG bất kỳ, theo một phương án là IgG1 hoặc IgG4, có ít nhất một đột biến trong E233, L234, L235, G236, D270, N297, E318, K320, K322, A327, A330, P331 và/hoặc P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Ngoài ra, theo một phương án khác, kháng thể của phân lớp IgG4 có đột biến S228P, hoặc các đột biến S228P và L235E (Angal, S., et al., Mol. Immunol. 30 (1993) 105-108) (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

Đầu tận C của chuỗi nặng của kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có thể là đầu kết thúc hoàn toàn đầu tận C bằng các gốc axit amin PGK. Đầu tận C của chuỗi nặng có thể là đầu tận C ngắn trong đó một hoặc hai gốc axit amin đầu tận C đã được loại bỏ. Theo một phương án được ưu tiên, đầu tận C của chuỗi nặng là đầu tận C rút gọn PG.

Theo các phương án nhất định, kháng thể được tạo ra trong bản mô tả này có thể còn được cải biến để chứa một hoặc nhiều modul vận chuyển hàng rào máu não đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có sẵn.

Modul vận chuyển hàng rào máu não được đặc trưng bởi có tính đặc hiệu liên kết đối với thụ thể hàng rào máu não. Tính đặc hiệu liên kết này có thể thu được bằng cách kết hợp modul vận chuyển hàng rào máu não với kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này hoặc nó có thể thu được bằng cách đưa tính đặc hiệu liên kết vào thụ thể hàng rào máu não như là một trong tính đặc hiệu liên kết của kháng thể đa đặc hiệu mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người và, do đó, bao gồm tính đặc hiệu liên kết của kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này và tính đặc hiệu liên kết với thụ thể hàng rào máu não.

Một hoặc nhiều modul vận chuyển hàng rào máu não có thể được dung hợp vào đầu tận bất kỳ của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này. Theo một phương án được ưu tiên, modul vận chuyển hàng rào máu não được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng.

Một hoặc nhiều modul vận chuyển hàng rào máu não có thể được dung hợp vào chuỗi kháng thể tương ứng trực tiếp hoặc thông qua liên kết peptit. Theo một phương

án được ưu tiên, peptit liên kết có trình tự axit amin GGS⁶GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41).

Modun vận chuyển hàng rào máu não có thể là mảnh kháng thể scFv. Theo một phương án, modun vận chuyển hàng rào máu não là scFv có đầu tận N đến đầu tận C theo thứ tự miền biến đổi chuỗi nhẹ - vùng hằng định chuỗi nhẹ-peptit liên kết-miền biến đổi chuỗi nặng -vùng hằng định chuỗi nặng 1.

Theo một phương án được ưu tiên, modun vận chuyển hàng rào máu não là mảnh scFv của thụ thể kháng transferin-kháng thể 8D3 với peptit liên kết (G4S)₆ hoặc biến thể được làm giống người của nó.

Thuật ngữ biến thể được làm giống người của nó chỉ phân tử thu được bằng cách ghép CDR của kháng thể 8D3 ở chuột trên khung làm việc ở người bằng việc đưa tùy ý một đến ba đột biến độc lập với nhau trong mỗi vùng khung làm việc (FR) và/hoặc vùng siêu biến (HVR).

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người có kháng thể kháng CD19 ở người, hai nhóm liên kết peptit và hai thực thể liên kết hóa trị một liên kết với thụ thể hàng rào máu não, trong đó liên kết này ghép đôi kháng thể kháng CD19 ở người với thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể hàng rào máu não.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người có kháng thể kháng CD19 ở người, nhóm liên kết peptit và một thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể hàng rào máu não, trong đó liên kết này ghép đôi kháng thể kháng CD19 ở người với thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể hàng rào máu não.

Theo một phương án, thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể hàng rào máu não được chọn từ nhóm bao gồm protein, polypeptit và peptit.

Theo một phương án, thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể hàng rào máu não chứa phân tử được chọn từ nhóm bao gồm phối tử thụ thể hàng rào máu não, scFv, Fv, scFab, VHH, theo một phương án được ưu tiên, là scFv hoặc scFab.

Theo một phương án, thụ thể hàng rào máu não được chọn từ nhóm bao gồm thụ thể transferin, thụ thể insulin, thụ thể yếu tố phát triển giống insulin, protein 8 liên quan

đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp, protein 1 liên quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp và yếu tố phát triển giống yếu tố phát triển biểu bì liên kết heparin. Theo một phương án được ưu tiên, thụ thể hàng rào máu não là thụ thể transferin.

Theo một phương án, thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể hàng rào máu não chứa một scFab hoặc một scFv trực tiếp với thụ thể transferin, cụ thể hơn scFab hoặc scFv nhận diện epitop trong thụ thể transferin được chứa trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42, 43 và 44.

Theo một phương án, thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể hàng rào máu não được ghép đôi với đầu tận C của chuỗi nặng của kháng thể kháng CD19 ở người bằng liên kết này.

Theo một phương án, nhóm liên kết peptit là trình tự axit amin có chiều dài ít nhất là 15 axit amin, tốt hơn nữa là có chiều dài từ 18 đến 25 axit amin.

Theo một phương án, kháng thể kháng CD19 ở người là kháng thể có chiều dài đầy đủ, theo một phương án được ưu tiên là IgG có chiều dài đầy đủ. Thuật ngữ kháng thể có chiều dài đầy đủ chỉ kháng thể bao gồm hai polypeptit chuỗi nhẹ của kháng thể và hai polypeptit chuỗi nặng của kháng thể, trong đó trong hai polypeptit chuỗi nặng của kháng thể, gốc lysin đầu tận C (K) có thể có mặt hoặc không.

Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người có kháng thể kháng CD19 ở người của IgG có chiều dài đầy đủ làm thực thể tác động não, nhóm liên kết của trình tự GGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41) và một scFab làm thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể transferin ở người làm thụ thể máu não, trong đó scFab được ghép đôi bởi liên kết này với đầu tận C (của phần Fc) của một trong số chuỗi nặng của kháng thể kháng CD19 ở người có chiều dài đầy đủ, và trong đó scFab nhận diện epitop trong thụ thể transferin ở người được chứa trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52, 53 và 54.

Theo một phương án được ưu tiên, polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người có kháng thể kháng CD19 ở người IgG có chiều dài đầy đủ làm thực thể tác động não, nhóm liên kết của trình tự GGSGGGSGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41) và một scFv làm thực thể liên kết hóa trị một mà liên kết với thụ thể transferin ở người làm thụ thể máu não, trong đó scFab được ghép đôi bởi liên kết này với đầu tận C (của phần Fc) của một trong số chuỗi nặng của kháng thể kháng CD19 ở người có

chiều dài đầy đủ, và trong đó scFab nhận diện epitop trong thụ thể transferin ở người được chứa trong trình tự axit amin của SEQ ID NO: 42, 43 và 44.

Theo một phương án, chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể kháng CD19 ở người chứa môđun dime hóa thứ nhất và chuỗi nặng thứ hai của kháng thể chứa môđun dime hóa thứ hai cho phép sự dị dime hóa của hai chuỗi nặng.

Theo một phương án, môđun dime hóa thứ nhất của chuỗi nặng thứ nhất của kháng thể kháng CD19 ở người là chuỗi nặng nút và môđun dime hóa của chuỗi nặng thứ hai của kháng thể kháng CD19 ở người là chuỗi nặng lỗ (theo chiến lược đóng nút vào lỗ).

Polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng để vận chuyển kháng thể kháng CD19 ở người qua hàng rào máu não.

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể kháng CD19 ở người được kết cặp ở đầu tận C của vùng Fc của nó với scFab làm thực thể liên kết hóa trị một liên kết với thụ thể transferin ở người có cấu trúc dưới đây theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C:

- chuỗi nặng IgG,
- nhóm liên kết peptit kết cặp đầu tận C của vùng Fc của chuỗi nặng IgG với đầu tận N của vùng VL của scFab, theo một phương án được ưu tiên, nhóm liên kết peptit có trình tự axit amin GSGGGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41),
- miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) và miền chuỗi nhẹ C-kappa của scFab,
- nhóm liên kết peptit kết cặp đầu tận C của miền chuỗi nhẹ C-kappa của scFab với đầu tận N của miền VH của scFab, theo một phương án được ưu tiên, nhóm liên kết peptit có trình tự axit amin (G₄S)₆GG (SEQ ID NO: 45),
- miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của kháng thể scFab và miền chuỗi nặng IgG CH1.

Theo một phương án, chuỗi nặng của kháng thể kháng CD19 ở người được kết cặp ở đầu tận C của vùng Fc của nó với scFv làm thực thể liên kết hóa trị một mà liên

kết với thụ thể transferin ở người có cấu trúc dưới đây theo hướng từ đầu tận N đến đầu tận C:

- chuỗi nặng IgG,
- nhóm liên kết peptit kết cặp đầu tận C của phần Fc của chuỗi nặng IgG với đầu tận N của vùng VL của mảnh kháng thể scFv, theo một phương án được ưu tiên, nhóm liên kết peptit là peptit có trình tự axit amin GGS⁶GGGSGGGGSGGGGS (SEQ ID NO: 41),
- miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL),
- nhóm liên kết peptit kết cặp đầu tận C của miền chuỗi nhẹ biến đổi với đầu tận N của miền VH của scFv, theo một phương án được ưu tiên, nhóm liên kết peptit là peptit có trình tự axit amin (G₄S)₆GG (SEQ ID NO: 45),
- miền chuỗi nặng biến đổi (VH) của mảnh kháng thể scFv.

Theo một phương án, modul vận chuyển hàng rào máu não/scFab hoặc scFv hướng đến thụ thể hàng rào máu não thu được từ kháng thể 8D3 có thụ thể kháng transferin được làm giống người (xem ví dụ Boado, R.J., et al., Biotechnol. Bioeng. 102 (2009) 1251-1258). Miền biến đổi chuỗi nặng của chuột có trình tự axit amin là

EVQLVESGGG LVQPGNSLTL SCVASGFTFS NYGMHWIRQA
PKKGLEWIAM IYYDSSKMNY ADTVKGRFTI SRDNSKNTLY LEMNSLRSED
TAMYYCAVPT SHYVVDVWGQ GVS⁵TVSS

(SEQ ID NO: 46).

Miền biến đổi chuỗi nhẹ của chuột (biến thể 1) có trình tự axit amin là

DIQMTQSPAS LSASLEEIVT ITCQASQDIG NWLAWYQQKP
GKSPQLLIYG ATSLADGVPS RFS⁵GSRS⁵GTQ FSLKISR⁵VQV EDIGIYYCLQ
AYNTPWTFGG GTKLELK

(SEQ ID NO: 47), và

miền biến đổi chuỗi nhẹ của chuột (biến thể 2) có trình tự axit amin là

DIQMTQSPAS LSASLEEIVT ITCQASQDIG NWLAWYQQKP
GKSPQLLIYG ATSLADGVPS RFS⁵GSRS⁵GTQ FSLKISR⁵VQV EDIGIYYCLQ
AYNTPWTFGG GTKVEIK

(SEQ ID NO: 48).

Theo một phương án về kháng thể kháng thụ thể transferin hoặc tính đặc hiệu liên kết thụ thể transferin có (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 51; (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 52; (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 53, 54 hoặc 55; (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 56; (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 57; và (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 58.

Theo một phương án, kháng thể kháng thụ thể transferin có ít nhất một cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 49 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50 tạo ra vị trí liên kết với thụ thể transferin.

Một môđun vận chuyển hàng rào máu não

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD19 ở người hoặc polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người chứa chính xác một tính đặc hiệu liên kết hàng rào máu não hoặc môđun vận chuyển, do đó ít nhất là đặc hiệu kép, trong đó tính đặc hiệu liên kết hàng rào máu não hoặc môđun vận chuyển có miền biến đổi được làm giống người của kháng thể 8D3 kháng thụ thể transferin ở người hoặc cặp miền biến đổi chuỗi nặng của SEQ ID NO: 49 và miền biến đổi chuỗi nhẹ của SEQ ID NO: 50, nhờ đó tính đặc hiệu liên kết hàng rào máu não hoặc môđun vận chuyển vận chuyển kháng thể kháng CD19 ở người qua hàng rào máu não.

Một hoặc hai môđun vận chuyển hàng rào máu não

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng CD19 ở người hoặc polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người có một hoặc hai tính đặc hiệu liên kết hàng rào máu não hoặc (các) môđun vận chuyển, do đó ít nhất là đặc hiệu kép, trong đó vị trí liên kết hoặc môđun vận chuyển hàng rào máu não thu được từ kháng thể mà liên kết bằng ái lực thấp với thụ thể hàng rào máu não (BBB-R, tính đặc hiệu liên kết BBB-R), nhờ đó tính đặc hiệu liên kết hàng rào máu não hoặc môđun vận chuyển thu được từ kháng thể mà liên kết bằng ái lực thấp với thụ thể hàng rào máu não vận chuyển kháng thể kháng CD19 ở người qua hàng rào máu não.

Theo một phương án, BBB-R được chọn từ nhóm bao gồm thụ thể transferin (TfR), thụ thể insulin, thụ thể yếu tố phát triển giống insulin (thụ thể IGF), protein 8 liên

quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp (LRP8), protein 1 liên quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp (LRP1), và yếu tố phát triển giống yếu tố phát triển biểu bì liên kết heparin (HB-EGF). Theo một khía cạnh khác, BBB-R là BBB-R ở người. Theo một khía cạnh, BBB-R là TfR. Theo một khía cạnh khác, BBB-R là TfR và kháng thể không ức chế hoạt tính TfR. Theo một khía cạnh khác, BBB-R là TfR và kháng thể không ức chế liên kết của TfR với transferin.

Theo một phương án, kháng thể này không ảnh hưởng đến liên kết của BBB-R với một hoặc nhiều trong số các phối tử tự nhiên của nó. Theo một phương án, kháng thể này tính đặc hiệu liên kết với thụ thể transferin ở người (hTfR) theo cách này không ức chế liên kết của hTfR với transferin ở người.

Theo một phương án, tính đặc hiệu liên kết BBB-R có IC_{50} đối với BBB-R nằm trong khoảng từ khoảng 1 nM đến khoảng 100 μ M. Theo một phương án, IC_{50} nằm trong khoảng từ khoảng 5 nM đến khoảng 100 μ M. Theo một phương án, IC_{50} nằm trong khoảng từ khoảng 50 nM đến khoảng 100 μ M. Theo một phương án, IC_{50} nằm trong khoảng từ khoảng 100 nM đến khoảng 100 μ M. Theo một phương án, tính đặc hiệu liên kết BBB-R có ái lực đối với BBB-R nằm trong khoảng từ khoảng 5 nM đến khoảng 10 μ M. Theo một phương án, tính đặc hiệu liên kết BBB-R, khi liên hợp với hoặc được chứa trong kháng thể kháng CD19 ở người, có ái lực đối với BBB-R nằm trong khoảng từ khoảng 30 nM đến khoảng 1 μ M. Theo một phương án, tính đặc hiệu liên kết BBB-R, khi liên hợp với hoặc được chứa trong kháng thể kháng CD19 ở người, có ái lực đối với BBB-R nằm trong khoảng từ khoảng 50 nM đến khoảng 1 μ M. Theo một phương án, ái lực của tính đặc hiệu liên kết BBB-R hoặc polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người đối với BBB-R được xác định bằng cách sử dụng phân tích Scatchard. Theo một phương án, ái lực của tính đặc hiệu liên kết BBB-R hoặc polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người đối với BBB-R được xác định bằng cách sử dụng phân tích BIACORE. Theo một phương án, ái lực của tính đặc hiệu liên kết BBB-R hoặc polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người đối với BBB-R được xác định bằng cách sử dụng ELISA cạnh tranh.

Sử dụng vận chuyển hàng rào máu não chứa polypeptit dung hợp của kháng thể

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp làm tăng sự tiếp xúc của CNS với kháng thể kháng CD19 ở người, trong đó kháng thể kháng CD19 ở người này

được kết cặp với kháng thể hoặc mảnh kháng thể mà liên kết bằng ái lực thấp với BBB-R, theo đó làm tăng sự tiếp xúc của CNS với kháng thể kháng CD19 ở người. Thuật ngữ “kết cặp” bao gồm các trường hợp trong đó tính đặc hiệu liên kết kháng thể kháng BBB-R được đưa vào làm tính đặc hiệu liên kết thứ hai trong ít nhất kháng thể kháng CD19/BBB-R ở người đặc hiệu kép. Theo một phương án, việc tăng tiếp xúc CNS với kháng thể kháng CD19 ở người được xác định tương ứng với việc tiếp xúc CNS của kháng thể kháng CD19 ở người được kết cặp với kháng thể điển hình không có ái lực được làm giảm đối với BBB-R. Theo một phương án, việc làm tăng tiếp xúc CNS với kháng thể kháng CD19 ở người được xác định như tỷ lệ của lượng kháng thể kháng CD19 ở người được tìm thấy trong CNS tương ứng với lượng được tìm thấy trong huyết thanh sau khi dùng. Theo một phương án, việc làm tăng tiếp xúc CNS dẫn đến tỷ lệ lớn hơn 0,1%. Theo một phương án, việc làm tăng tiếp xúc CNS với kháng thể kháng CD19 ở người được xác định tương ứng với sự tiếp xúc CNS của kháng thể kháng CD19 ở người trong sự vắng mặt của kháng thể kháng BBB-R được kết cặp. Theo một phương án, việc làm tăng tiếp xúc CNS với kháng thể kháng CD19 ở người được xác định bằng hình ảnh. Theo một phương án, việc làm tăng tiếp xúc CNS với kháng thể kháng CD19 ở người được xác định bằng cách đọc gián tiếp như sự cải biến của một hoặc nhiều triệu chứng sinh lý.

Phương pháp làm tăng sự duy trì của kháng thể kháng CD19 ở người trong CNS được dùng cho đối tượng, trong đó kháng thể kháng CD19 ở người được kết cặp với kháng thể hoặc mảnh kháng thể, mà liên kết bằng ái lực thấp với BBB-R, sao cho sự duy trì của kháng thể kháng CD19 ở người trong CNS được tăng lên.

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất phương pháp tối ưu hóa được động học và/hoặc dược lực học của kháng thể kháng CD19 ở người hiệu quả trong CNS của đối tượng, trong đó kháng thể kháng CD19 ở người được kết cặp với kháng thể hoặc mảnh kháng thể, mà liên kết bằng ái lực thấp với BBB-R, nhờ đó kháng thể hoặc mảnh kháng thể được chọn sao cho ái lực của nó đối với BBB-R sau khi kết cặp với kháng thể kháng CD19 ở người dẫn đến kết quả là lượng vận chuyển của kháng thể hoặc mảnh kháng thể liên hợp với kháng thể kháng CD19 ở người qua BBB mà tối ưu hóa được động học và/hoặc dược lực học của kháng thể kháng CD19 ở người trong CNS.

Theo phương án khác sáng chế mô tả phương pháp điều trị rối loạn thần kinh ở động vật có vú bao gồm việc điều trị động vật có vú bằng kháng thể hoặc mảnh kháng thể, mà liên kết BBB-R và được kết cặp với kháng thể kháng CD19 ở người, trong đó kháng thể này được chọn để có ái lực thấp đối với BBB-R và theo đó cải thiện sự hấp thụ CNS của kháng thể và kháng thể kháng CD19 ở người được kết cặp. Theo một phương án, việc điều trị dẫn đến kết quả là làm giảm bớt hoặc giảm thiểu của các triệu chứng rối loạn. Theo một khía cạnh khác, việc điều trị dẫn đến cải thiện rối loạn thần kinh.

Theo một phương án của tất cả các khía cạnh trước, kháng thể kháng BBB-R có IC_{50} đối với BBB-R nằm trong khoảng từ khoảng 1 nM đến khoảng 100 μ M. Theo một phương án khác, IC_{50} nằm trong khoảng từ khoảng 5 nM đến khoảng 100 μ M. Theo một phương án khác, IC_{50} nằm trong khoảng từ khoảng 50 nM đến khoảng 100 μ M. Theo một phương án khác, IC_{50} nằm trong khoảng từ khoảng 100 nM đến khoảng 100 μ M. Theo phương án khác, kháng thể có ái lực đối với BBB-R nằm trong khoảng từ khoảng 5 nM đến khoảng 10 μ M. Theo phương án khác, kháng thể, khi kết cặp với kháng thể kháng CD19 ở người, có ái lực đối với BBB-R nằm trong khoảng từ khoảng 30 nM đến khoảng 1 μ M. Theo phương án khác, kháng thể, khi kết cặp với kháng thể kháng CD19 ở người, có ái lực đối với BBB-R nằm trong khoảng từ khoảng 50 nM đến khoảng 1 μ M. Theo một phương án, ái lực của kháng thể kháng BBB-R hoặc polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người đối với BBB-R được xác định bằng cách sử dụng phân tích Scatchard. Theo phương án khác, ái lực của kháng thể kháng BBB-R hoặc polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người đối với BBB-R được xác định bằng cách sử dụng phân tích BIACORE. Theo phương án khác, ái lực của kháng thể kháng BBB-R hoặc polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người đối với BBB-R được xác định bằng cách sử dụng ELISA cạnh tranh.

Theo phương án khác, polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người được đánh dấu. Theo phương án khác, kháng thể kháng BBB-R hoặc mảnh không ảnh hưởng đến liên kết của BBB-R với một hoặc nhiều các phối tử tự nhiên của nó. Theo phương án khác, kháng thể kháng BBB-R tính đặc hiệu liên kết với hTfR theo cách mà nó không ức chế liên kết của hTfR với transferin ở người. Theo phương án khác, polypeptit dung hợp của kháng thể kháng CD19 ở người được dùng cho động vật có vú. Theo phương án khác, động vật có vú là người. Theo phương án khác, động vật có vú

bị rối loạn thần kinh. Theo phương án khác, rối loạn thần kinh được chọn từ nhóm bao gồm bệnh Alzheimer (AD - Alzheimer's disease), đột quỵ, bệnh sa sút trí tuệ, chứng loạn dưỡng cơ (MD - muscular dystrophy), bệnh xơ cứng rải rác (MS - multiple sclerosis), bệnh xơ cứng cột bên teo cơ (ALS - amyotrophic lateral sclerosis), bệnh xơ nang, hội chứng Angelman, hội chứng Liddle, bệnh Parkinson, bệnh Pick, bệnh Paget, ung thư, và tổn thương não do chấn thương.

Các phức chất không cộng hóa trị làm vận chuyển hàng rào máu não

Một phần của phức chất không cộng hóa trị là modul vận chuyển hàng rào máu não (modul vận chuyển BBB) là kháng thể đặc hiệu kép có tính đặc hiệu liên kết thứ nhất đối với hapten và tính đặc hiệu liên kết thứ hai đối với thụ thể hàng rào máu não (BBBR - blood-brain-barrier receptor). Modul vận chuyển BBB nhận diện đích bề mặt tế bào có thể cấy ghép trên hàng rào máu não (như TfR, LRP hoặc các đích khác, BBB-R) và đồng thời liên kết với kháng thể kháng CD19 ở người được hapten hóa.

Chi tiết hơn, kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người được liên hợp với hapten và được tạo phức bởi vị trí liên kết hapten của vận chuyển hàng rào máu não. Phức chất này được xác định và ổn định và vận chuyển đặc hiệu kháng thể được hapten hóa mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người qua hàng rào máu não. Bởi vì kháng thể được hapten hóa mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người được tạo phức theo cách không cộng hóa trị bằng vận chuyển hàng rào máu não, kháng thể được hapten hóa này tính đặc hiệu liên kết với CD19 ở người một mặt liên kết với chất dẫn thuốc vận chuyển của nó (=vận chuyển hàng rào máu não = kháng thể đặc hiệu kép) trong suốt thời gian của nó trong vòng tuần hoàn nhưng mặt khác có thể cũng được giải phóng một cách hiệu quả sau khi vận chuyển qua tế bào. Sự liên hợp với hapten có thể bị ảnh hưởng mà không có sự can thiệp bằng hoạt động của kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người. Vận chuyển hàng rào máu não không chứa chất bổ sung cộng hóa trị khác thường và do đó phòng ngừa bất kỳ nguy cơ sinh miễn dịch nào. Các phức chất của kháng thể được hapten hóa mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người bằng kháng thể đặc hiệu kép có vị trí tính đặc hiệu liên kết hapten sinh ra tập tính sinh lý lành tính với kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người. Hơn thế nữa, các phức chất này có khả năng hướng đích tải các tế bào hoặc mô mà thể hiện kháng nguyên được nhận diện bởi tính đặc hiệu liên kết thứ hai của kháng thể đặc hiệu kép.

Kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người giữ được chức năng của nó mặc dù được hapten hóa, cũng như được tạo phức bởi vận chuyển hàng rào máu não (=kháng thể đặc hiệu kép). Ngoài ra, vị trí liên kết thụ thể hàng rào máu não của kháng thể đặc hiệu kép giữ được tính đặc hiệu liên kết của nó và ái lực trong sự có mặt của kháng thể được hapten hóa được tạo phức mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người. Các phức chất của kháng thể được hapten hóa mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người với kháng thể đặc hiệu kép như được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng để hướng đích kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người đặc hiệu với các tế bào biểu hiện thụ thể hàng rào máu não. Bởi vì kháng thể được hapten hóa này tính đặc hiệu liên kết với CD19 ở người được kết cặp theo cách không cộng hóa trị với kháng thể đặc hiệu kép kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người có thể được giải phóng sau khi vào trong hoặc vận chuyển qua tế bào.

Theo khía cạnh khác, kháng thể kháng CD19 ở người theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể kết hợp các đặc tính bất kỳ, riêng lẻ hoặc kết hợp, như được mô tả phần 1-5 dưới đây:

1. Ái lực kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể nêu trong bản mô tả này có giá trị $K_D \leq 1 \mu M$, $\leq 100 \text{ nM}$, hoặc $\leq 10 \text{ nM}$ (ví dụ 10^{-8} M hoặc ít hơn, ví dụ từ 10^{-7} M đến 10^{-8} M).

Ví dụ, K_D có thể được xác định bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®. Thử nghiệm sử dụng BIACORE®-2000 hoặc BIACORE®-3000 (Biacore, Inc., Piscataway, NJ) được thực hiện ở nhiệt độ 25°C bằng chip kháng nguyên bất động CM5 ở ~10 đơn vị đáp ứng (RU - response unit). Chip cảm biến sinh học dextran được carboxymetyl hóa (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hóa bằng *N*-ethyl-*N'*-(3-dimethylaminopropyl)-carbodiimide hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysuccinimide (NHS) theo hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng bằng 10 mM natri axetat, pH 4,8, đến 5 µg/ml (~0,2 µM) trước khi tiêm ở tốc độ dòng bằng 5 µL/phút để đạt được xấp xỉ 10 đơn vị đáp ứng (RU) của protein được kết cặp. Sau khi tiêm kháng nguyên, 1 M etanolamin được tiêm để phong bế nhóm chưa phản ứng. Để xác định động lực học, pha loãng liên tiếp hai lần Fab (0,78 nM đến 500 nM) được tiêm trong PBS có 0,05% polysorbate 20 (TWEEN-20™) chất hoạt động bề mặt (PBST) ở nhiệt độ 25°C ở tốc độ dòng bằng xấp xỉ 25 µL/phút. Tốc độ kết hợp (k_{on}) và tốc độ phân ly (k_{off}) được

tính toán bằng cách sử dụng mô hình liên kết Langmuir đơn giản một một (phần mềm đánh giá BIACORE[®] phiên bản 3.2) bằng cách lắp khít đồng thời biểu đồ cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính toán theo tỷ lệ k_{off}/k_{on} (xem, ví dụ, Chen, Y. và các đồng tác giả, J. Mol. Biol. 293 (1999) 865-881).

2. Các mảnh kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là mảnh kháng thể. Các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, mảnh Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂, Fv, và scFv, và các mảnh khác được mô tả dưới đây. Để xem xét các mảnh kháng thể nhất định, xem Hudson, P.J. và các đồng tác giả, Nat. Med. 9 (2003) 129-134. Để xem xét mảnh scFv, xem, ví dụ, Plueckthun, A., trong tài liệu; The Pharmacology of Monoclonal Antibodies, Vol. 113, Rosenberg and Moore (eds.), Springer-Verlag, New York (1994), các trang 269-315; cũng xem trong WO 93/16185; US 5,571,894 và US 5,587,458. Để thảo luận về các mảnh Fab và F(ab')₂ chứa gốc epitop liên kết thụ thể cứu và có thời gian bán hủy tăng trong in vivo, xem US 5,869,046.

Kháng thể thể đôi là các mảnh kháng thể có hai vị trí liên kết kháng nguyên có thể là hai hóa trị hoặc đặc hiệu kép. Xem, ví dụ, EP 0 404 097; WO 1993/01161; Hudson, P.J. và các đồng tác giả, Nat. Med. 9 (2003) 129-134; và Holliger, P. và các đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448. Kháng thể thể ba và kháng thể thể bốn cũng được mô tả bởi Hudson, P.J. và các đồng tác giả, Nat. Med. 9 (2003) 129-134).

Kháng thể đơn miền là các mảnh kháng thể chứa tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể đơn miền là kháng thể đơn miền ở người (Domantis, Inc., Waltham, MA; xem, ví dụ, US 6,248,516).

Các mảnh kháng thể có thể được tạo ra bằng các kỹ thuật khác nhau, bao gồm nhưng không giới hạn ở, sự tiêu hóa phân giải protein của kháng thể nguyên vẹn cũng như sản xuất bằng các tế bào chủ tái tổ hợp (ví dụ E. coli hoặc thực khuẩn thể), như được mô tả trong bản mô tả này.

3. Kháng thể khảm và kháng thể được làm giống người

Kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này là kháng thể khảm. Kháng thể khảm nhất định như được mô tả, ví dụ, trong US 4,816,567; và Morrison, S.L. và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 81 (1984) 6851-6855). Trong một ví dụ, kháng thể khảm có vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi thu được từ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, thỏ, hoặc linh trưởng không phải người, như khỉ) và vùng hằng định ở người. Theo ví dụ khác, kháng thể khảm là kháng thể “được chuyển lớp” trong đó lớp hoặc phân lớp được thay đổi từ lớp hoặc phân lớp của kháng thể gốc. Kháng thể khảm bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên của nó.

Kháng thể được làm giống người là kháng thể khảm. Thông thường, kháng thể không phải ở người được làm giống người để làm giảm tính sinh miễn dịch đối với người, trong khi giữ được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể không phải ở người của bố mẹ. Thông thường, kháng thể được làm giống người bao gồm một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó HVR, ví dụ, CDR, (hoặc các phần của nó) thu được từ kháng thể không phải ở người, và FR (hoặc các phần của nó) thu được từ trình tự kháng thể ở người. Kháng thể được làm giống người tùy ý cũng sẽ có ít nhất một phần của vùng hằng định ở người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được làm giống người được thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải ở người (ví dụ, kháng thể từ đó gốc HVR thu được), ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Kháng thể được làm giống người và phương pháp tạo ra chúng được xem xét, ví dụ, trong Almagro, J.C. và Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, và còn được mô tả, ví dụ, trong Riechmann, I. và các đồng tác giả, *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; US 5, 821,337, US 7,527,791, US 6,982,321, và US 7,087,409; Kashmiri, S.V. và các đồng tác giả, *Methods* 36 (2005) 25-34 (mô tả ghép vùng xác định tính đặc hiệu (SDR – specificity determining region)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (mô tả “sự tái tạo bề mặt”); Dall’Acqua, W.F. et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (mô tả “sự bố trí lại FR”); và Osbourn, J. và các đồng tác giả, *Methods* 36 (2005) 61-68 và Klimka, A. và các đồng tác giả, *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (mô tả phương pháp “lựa chọn theo chỉ dẫn” đối với sự bố trí lại FR).

Vùng khung làm việc ở người có thể được sử dụng để làm giống người bao gồm nhưng không giới hạn ở: vùng khung làm việc được chọn bằng cách sử dụng phương pháp "phù hợp nhất" (xem, ví dụ, Sims, M.J. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; vùng khung làm việc thu được từ trình tự liên ứng của kháng thể ở người của nhóm phụ cụ thể của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ (xem, ví dụ, Carter, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; và Presta, L.G. và các đồng tác giả, *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); vùng khung làm việc trưởng thành ở người (các đột biến soma) hoặc vùng khung làm việc dòng mầm ở người (xem, ví dụ, Almagro, J.C. và Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); và vùng khung làm việc thu được từ thư viện FR sàng lọc (xem, ví dụ, Baca, M. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 và Rosok, M.J. và các đồng tác giả, *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

4. Kháng thể đa đặc hiệu

Theo các phương án nhất định, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ kháng thể đặc hiệu kép. Kháng thể đa đặc hiệu là kháng thể đơn dòng mà có tính đặc hiệu liên kết đối với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo các phương án nhất định, một trong số các tính đặc hiệu liên kết đối với CD19 ở người và tính đặc hiệu liên kết khác là đối với kháng nguyên bất kỳ khác. Theo các phương án nhất định, kháng thể đặc hiệu kép có thể liên kết với hai epitop khác nhau của CD19 ở người. Kháng thể đặc hiệu kép cũng có thể được sử dụng để định vị chất gây độc tế bào đối với các tế bào mà biểu hiện CD19 ở người. Kháng thể đặc hiệu kép có thể được chuẩn bị làm kháng thể có chiều dài đầy đủ hoặc các mảnh kháng thể.

Các kỹ thuật để tạo ra kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sự đồng biểu hiện tái tổ hợp của hai cặp globulin miễn dịch chuỗi nặng-chuỗi nhẹ có tính đặc hiệu khác nhau (xem Milstein, C. và Cuello, A.C., *Nature* 305 (1983) 537-540, WO 93/08829, và Traunecker, A. và các đồng tác giả, *EMBO J.* 10 (1991) 3655-3659), và kỹ thuật "đóng nút vào lỗ" (xem, ví dụ, US 5,731,168). Kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được tạo ra bằng cách thiết kế hiệu ứng điều chỉnh tĩnh điện để tạo ra các phân tử kháng thể Fc-dị dime (WO 2009/089004); hai hoặc nhiều kháng thể hoặc mảnh liên kết ngang (xem, ví dụ, US 4,676,980, và Brennan, M. et al., *Science* 229 (1985) 81-83); bằng cách sử dụng dây kéo leuxin để tạo ra kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Kostelny, S.A. et al., *J. Immunol.* 148 (1992) 1547-1553; bằng cách sử dụng công nghệ "kháng

thể thể đôi" để tạo ra các mảnh kháng thể đặc hiệu kép (xem, ví dụ, Holliger, P. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 90 (1993) 6444-6448); và bằng cách sử dụng dime Fv chuỗi đơn (sFv) (xem, ví dụ Gruber, M et al., J. Immunol. 152 (1994) 5368-5374); và chuẩn bị kháng thể ba đặc hiệu như được mô tả, ví dụ, trong Tutt, A. et al., J. Immunol. 147 (1991) 60-69).

Kháng thể được thiết kế có ba hoặc nhiều vị trí liên kết kháng nguyên có chức năng, bao gồm "kháng thể bạch tuộc" cũng được nêu trong bản mô tả này (xem, ví dụ US 2006/0025576).

Kháng thể hoặc mảnh trong bản mô tả này cũng bao gồm "Fab tác động kép" hoặc "DAF" chứa vị trí liên kết kháng nguyên mà liên kết với CD19 ở người cũng như với một kháng nguyên khác (xem, US 2008/0069820, ví dụ).

Kháng thể hoặc mảnh trong bản mô tả này cũng bao gồm kháng thể đa đặc hiệu được mô tả trong WO 2009/080251, WO 2009/080252, WO 2009/080253, WO 2009/080254, WO 2010/112193, WO 2010/115589, WO 2010/136172, WO 2010/145792, và WO 2010/145793.

5. Các biến thể kháng thể

Theo các phương án nhất định, các biến thể trình tự axit amin của kháng thể được mô tả trong bản mô tả này được dự định. Ví dụ, có thể được mong muốn để cải thiện ái lực liên kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được chuẩn bị bằng cách đưa sự cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng cách tổng hợp peptit. Các cải biến này bao gồm, ví dụ, mất, và/hoặc chèn vào và/hoặc thay thế gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Sự kết hợp bất kỳ của sự mất, chèn, và thế có thể được tạo ra đến cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng có các đặc tính mong muốn, ví dụ, liên kết kháng nguyên.

a) Các biến thể thế, chèn, và mất

Theo các phương án nhất định, các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều sự thế axit amin được mô tả. Vị trí cần quan tâm để sinh đột biến thế bao gồm HVR và FR. Sự thay thế bảo toàn được thể hiện trong bảng dưới đây dưới tiêu đề "sự thay thế được ưu tiên". Các thay đổi đáng kể hơn được nêu trong bảng 1 dưới tiêu đề "sự thay thế tiêu

biểu" và như được mô tả thêm dưới đây khi xem xét các lớp chuỗi bên axit amin. Sự thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể cần quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc cho các hoạt động mong muốn, ví dụ, liên kết cải thiện/giữ lại được kháng nguyên, làm giảm tính sinh miễn dịch, hoặc làm cải thiện ADCC hoặc CDC.

Gốc ban đầu	Sự thay thế tiêu biểu	Sự thay thế được ưu tiên
Ala (A)	Val; Leu; Ile	Val
Arg (R)	Lys; Gln; Asn	Lys
Asn (N)	Gln; His; Asp, Lys; Arg	Gln
Asp (D)	Glu; Asn	Glu
Cys (C)	Ser; Ala	Ser
Gln (Q)	Asn; Glu	Asn
Glu (E)	Asp; Gln	Asp
Gly (G)	Ala	Ala
His (H)	Asn; Gln; Lys; Arg	Arg
Ile (I)	Leu; Val; Met; Ala; Phe; Norleuxin	Leu
Leu (L)	Norleuxin; Ile; Val; Met; Ala; Phe	Ile
Lys (K)	Arg; Gln; Asn	Arg
Met (M)	Leu; Phe; Ile	Leu
Phe (F)	Trp; Leu; Val; Ile; Ala; Tyr	Tyr
Pro (P)	Ala	Ala
Ser (S)	Thr	Thr
Thr (T)	Val; Ser	Ser
Trp (W)	Tyr; Phe	Tyr
Tyr (Y)	Trp; Phe; Thr; Ser	Phe
Val (V)	Ile; Leu; Met; Phe; Ala; Norleuxin	Leu

Axit amin có thể được nhóm theo các tính chất phổ biến của chuỗi bên:

- (1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;
- (2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;
- (3) tính axit: Asp, Glu;
- (4) tính bazơ: His, Lys, Arg;
- (5) các gốc mà ảnh hưởng đến định hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Sự thể không bảo toàn sẽ đòi hỏi phải trao đổi thành viên của một trong số các lớp này cho lớp khác.

Một loại biến thể thể liên quan đến việc thể một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể gốc (ví dụ kháng thể được làm giống người hoặc kháng thể ở người). Thông thường, (các) biến thể tạo thành được chọn để nghiên cứu thêm sẽ có các cải biến (ví dụ, cải thiện) trong các tính chất sinh học nhất định (ví dụ, ái lực tăng, tính sinh miễn dịch giảm) so với kháng thể gốc và/hoặc sẽ giữ lại đáng kể các tính chất sinh học nhất định của kháng thể gốc. Biến thể thể tiêu biểu là kháng thể thuần thực ái lực, có thể được tạo ra thuận lợi, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật thuần thực ái lực dựa trên sự thể hiện thực khuẩn thể như các kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này. Tóm lại, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và biến thể kháng thể được thể hiện trên thực khuẩn thể và được sàng lọc cho hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ ái lực liên kết).

Thay đổi (ví dụ, thay thế) có thể được tạo ra trong HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực kháng thể. Sự thay đổi này có thể được tạo ra trong “các điểm” HVR nghĩa là, các gốc được mã hóa bởi codon mà trải qua đột biến với tần suất cao trong quá trình hình thành soma (xem, ví dụ, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), và/hoặc gốc mà tiếp xúc kháng nguyên, với biến thể VH hoặc VL tạo thành được kiểm tra đối với ái lực liên kết. Sự thuần thực ái lực bằng cách cấu trúc và chọn lại từ thư viện thứ cấp được mô tả, ví dụ, trong Hoogenboom, H.R. và các đồng tác giả trong *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. Theo một vài phương án về sự thuần thực ái lực, sự đa dạng được đưa vào trong gen biến đổi được chọn để thuần thực bởi bất kỳ một loạt các phương pháp (ví dụ, PCR sai hỏng, xáo trộn chuỗi, hoặc gây đột biến nhằm vào oligonucleotit). Thư viện thứ cấp sau đó được tạo ra. Thư viện này sau đó được sàng lọc để xác định các biến thể kháng thể bất kỳ có ái lực mong muốn. Phương pháp khác để đưa các phương pháp tiếp cận trực tiếp HVR liên quan đến sự đa dạng, trong đó nhiều gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc cùng thời điểm) được chọn ngẫu nhiên. Các gốc HVR liên quan đến liên kết kháng nguyên có thể được xác định cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng alanin quét gây đột biến hoặc mô hình hóa. CDR-H3 và CDR-L3 cụ thể thường được hướng đích.

Theo các phương án nhất định, sự thay thế, chèn, hoặc mất có thể xảy ra trong một hoặc nhiều HVR miễn là sự thay đổi này không làm giảm đáng kể khả năng của kháng thể để liên kết kháng nguyên. Ví dụ, thay thế bảo toàn (ví dụ, thay thế bảo toàn như được nêu trong bản mô tả này) không làm giảm đáng kể ái lực liên kết có thể được tạo ra trong các HVR. Thay đổi này có thể, ví dụ, ngoài các gốc tiếp xúc kháng nguyên trong HVR. Theo các phương án nhất định của biến thể trình tự VH và VL được nêu trên, mỗi HVR không được thay thế, hoặc không chứa nhiều hơn một, hai hoặc ba sự thay thế axit amin.

Phương pháp hữu ích để xác định gốc hoặc vùng của kháng thể mà có thể được hướng đích để gây đột biến được gọi là "alanin quét gây đột biến" như được mô tả bởi Cunningham, B.C. và Wells, J.A., Science 244 (1989) 1081-1085. Phương pháp này, gốc hoặc nhóm của các gốc đích (ví dụ, các gốc tích điện như arg, asp, his, lys, và glu) được xác định và được thay thế bằng axit amin tích điện trung tính hoặc axit amin tích điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Sự thay thế có thể được đưa vào ở vị trí axit amin chứng minh độ nhạy về chức năng đối với sự thay thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức chất kháng nguyên-kháng thể để xác định điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc liên kề có thể được hướng đích hoặc được giảm thiểu làm đối tượng để thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem liệu chúng có chứa các tính chất mong muốn hay không.

Việc chèn trình tự axit amin bao gồm dung hợp đầu tận amino- và/hoặc carboxyl- có giới hạn chiều dài từ một gốc đến polypeptit chứa hàng trăm gốc hoặc nhiều gốc, cũng như việc chèn trong trình tự của một hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về việc chèn đầu tận bao gồm kháng thể có gốc methionyl đầu tận N. Các biến thể chèn khác của phân tử kháng thể bao gồm việc dung hợp với đầu tận N hoặc C của kháng thể đối với enzyme (ví dụ đối với ADEPT) hoặc polypeptit làm tăng thời gian bán hủy huyết thanh của kháng thể.

b) Các biến thể glycosyl hóa

Theo các phương án nhất định, kháng thể được mô tả trong bản mô tả này được thay đổi để làm tăng hoặc làm giảm mức độ kháng thể được glycosyl hóa. Thêm hoặc khuyết vị trí glycosyl hóa vào kháng thể có thể được thực hiện thuận lợi bằng cách thay

đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc được loại bỏ.

Kháng thể bao gồm vùng Fc, hydrat cacbon được gắn vào đó có thể được thay đổi. Kháng thể tự nhiên được sản xuất bởi các tế bào động vật có vú thông thường chứa oligosacarit mạch nhánh, hai râu thường được gắn bởi liên kết N với Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Xem, ví dụ, Wright, A. và Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32. Oligosacarit có thể bao gồm các hydrat cacbon khác nhau, ví dụ, mannoza, N-acetyl glucosamin (GlcNAc), galactosa, và axit sialic, cũng như fucosa được gắn vào GlcNAc trong “thân” của cấu trúc oligosacarit hai râu. Theo một vài phương án, sự cải biến của oligosacarit trong kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có thể được thực hiện để tạo ra các biến thể kháng thể có các tính chất được cải thiện nhất định.

Theo một phương án, các biến thể kháng thể được mô tả có cấu trúc hydrat cacbon mà thiếu fucosa được gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Ví dụ, lượng fucosa trong kháng thể này có thể nằm trong khoảng từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng fucosa được xác định bằng việc tính toán lượng trung bình của fucosa trong chuỗi đường ở Asn297, tương ứng với tổng tất cả cấu trúc glycol được gắn vào Asn 297 (ví dụ cấu trúc mannoza phức tạp, lai và cao) như được xác định bởi phổ khối MALDI-TOF, như được mô tả trong WO 2008/077546, ví dụ. Asn297 đề cập đến gốc asparagin được định vị ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (đánh số EU các gốc vùng Fc theo Kabat); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể nằm ở hướng xuôi hoặc hướng ngược khoảng ± 3 axit amin của vị trí 297, nghĩa là, nằm ở các vị trí nằm trong khoảng từ 294 đến 300, do sự biến đổi trình tự nhỏ trong kháng thể. Các biến thể fucosyl hóa này có thể có chức năng ADCC được cải thiện. Xem, ví dụ, US 2003/0157108; US 2004/0093621. Các ví dụ về các công bố liên quan đến các biến thể kháng thể “khử fucosyl hóa” hoặc “thiếu fucosa” bao gồm: US 2003/0157108; WO 2000/61739; WO 2001/29246; US 2003/0115614; US 2002/0164328; US 2004/0093621; US 2004/0132140; US 2004/0110704; US 2004/0110282; US 2004/0109865; WO 2003/085119; WO 2003/084570; WO 2005/035586; WO 2005/035778; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. và các đồng tác giả, J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. và các đồng tác giả, Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Các ví dụ về các dòng tế bào có thể tạo ra kháng thể khử fucosyl bao gồm các tế bào Lec13 CHO không hiệu quả trong quá trình fucosyl hóa protein (Ripka, J. et al.,

Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; US 2003/0157108; và WO 2004/056312, cụ thể ở ví dụ 11), và dòng tế bào bất hoạt, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8*, các tế bào CHO bất hoạt (xem, ví dụ, Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; và WO 2003/085107).

Các biến thể kháng thể còn đề xuất oligosacarit được cắt đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai râu được gắn vào vùng Fc của kháng thể được cắt đôi bởi GlcNAc. Các biến thể kháng thể này đã làm giảm quá trình fucosyl hóa được khử và/hoặc chức năng ADCC được cải thiện. Các ví dụ về các biến thể kháng thể này như được đề xuất, ví dụ, trong WO 2003/011878; US 6,602,684; và US 2005/0123546. Các biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactosa trong oligosacarit được gắn vào vùng Fc cũng được mô tả. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC được cải thiện. Các biến thể kháng thể này như được mô tả, ví dụ, trong WO 1997/30087; WO 1998/58964; và WO 1999/22764.

c) Các biến thể vùng Fc

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều biến đổi axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này, theo đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể chứa trình tự vùng Fc ở người (ví dụ, vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 ở người) chứa cải biến axit amin (ví dụ thể) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất biến thể kháng thể mà có một vài nhưng không phải tất cả chức năng tác động, mà làm cho nó là đối tượng mong muốn cho các ứng dụng trong đó thời gian bán hủy của kháng thể *in vivo* là chức năng tác động nhất định quan trọng (như bổ thể và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Thử nghiệm tính độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được thực hiện để xác định sự giảm/tiêu của hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể thiếu liên kết FcγR (do đó có thể thiếu hoạt tính ADCC), nhưng giữ được khả năng liên kết FcRn. Các tế bào sơ cấp để điều chỉnh ADCC, các tế bào NK, chỉ biểu hiện Fc(R)III, trong đó bạch cầu đơn nhân biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện FcR trên các tế bào tạo huyết được tổng hợp trong bảng 3 trên trang 464 của Ravetch, J.V. và Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol.

9 (1991) 457-492. Các ví dụ không giới hạn về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm được mô tả trong US 5,500,362 (xem, ví dụ Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; và Hellstrom, I. và các đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); US 5,821,337 (xem Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). Thay vào đó, các phương pháp thử nghiệm không phóng xạ có thể được thực hiện (xem, ví dụ, thử nghiệm tính độc tế bào không phóng xạ ACTI™ để phân tích tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm tính độc tế bào không phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Các tế bào tác động hữu ích cho các thử nghiệm này bao gồm tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và các tế bào giết tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử cần quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như được mô tả trong Clynes, R. và các đồng tác giả, Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. Các thử nghiệm liên kết C1q có thể cũng được thực hiện để xác định kháng thể này không thể liên kết C1q và do đó thiếu hoạt tính CDC. Xem, ví dụ, C1q và C3c liên kết ELISA trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem, ví dụ, Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052; và Cragg, M.S. và M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). Liên kết FcRn và xác định sự thanh thải *in vivo*/thời gian bán hủy cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật (xem, ví dụ, Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006) 1759-1769).

Kháng thể có chức năng tác động được làm giảm bao gồm kháng thể thể của một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (US 6,737,056). Các đột biến Fc này bao gồm các đột biến Fc với sự thay thế ở hai hoặc nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm đột biến Fc “DANA” với sự thay thế các gốc 265 và 297 bằng alanin (US 7,332,581).

Các biến thể kháng thể nhất định có liên kết được cải thiện hoặc được làm giảm đối với FcR như được mô tả. (Xem, ví dụ, US 6,737,056; WO 2004/056312, và Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604)

Theo các phương án nhất định, biến thể kháng thể bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều sự thay thế axit amin làm cải thiện ADCC, ví dụ, thay thế ở các vị trí 298, 333, và/hoặc 334 của vùng Fc (đánh số EU các gốc).

Theo một vài phương án, biến đổi được thực hiện trong vùng Fc làm biến đổi (*nghĩa là*, được cải thiện hoặc được làm giảm) liên kết C1q và/hoặc tính độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement dependent cytotoxicity), ví dụ, như được mô tả trong US 6,194,551, WO 99/51642, và Idusogie, E.E. và các đồng tác giả, J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Kháng thể có thời gian bán hủy được tăng và liên kết được cải thiện với thụ thể Fc của trẻ sơ sinh (FcRn), chịu trách nhiệm cho sự chuyển IgG bố mẹ đến thai nhi (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, và Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), như được mô tả trong US 2005/0014934. Các kháng thể này bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều sự thay thế trong đó cải thiện liên kết của vùng Fc với FcRn. Các biến thể Fc này bao gồm các biến thể có sự thay thế ở một hoặc nhiều gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, sự thế gốc vùng Fc 434 (US 7,371,826).

Cũng xem Duncan, A.R. và Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5,648,260; US 5,624,821; và WO 94/29351 liên quan đến các ví dụ khác của các biến thể vùng Fc.

d) Các biến thể kháng thể được thiết kế xystein

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn để tạo ra kháng thể được thiết kế xystein, ví dụ, “thioMAb” trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thế bằng các gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thế xảy ra ở vị trí có thể dễ bị ảnh hưởng của kháng thể. Bằng cách thay thế các gốc này bằng xystein, theo đó các nhóm thiol phản ứng được định vị ở vị trí có thể dễ bị ảnh hưởng của kháng thể và có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể với các gốc khác, như các gốc của dược chất hoặc các gốc liên kết dược chất, để tạo ra thể liên hợp miễn dịch, như được mô tả trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, bất kỳ một hoặc nhiều các gốc dưới đây có thể được thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số EU) của vùng chuỗi nặng Fc. Kháng thể được thiết kế xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong US 7,521,541.

e) Dẫn xuất kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề xuất trong bản mô tả này có thể được cải biến thêm để chứa gốc không có protein khác đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật và có sẵn. Các gốc thích hợp để dẫn xuất hóa kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyme tan trong nước. Các ví dụ không giới hạn về polyme tan trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymethylxenluloza, dextran, rượu polyvinyllic, polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, polyaminoaxit (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, polypropylen oxit/etylen oxit copolyme, rượu polyhydric được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyllic, và hỗn hợp của nó. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có lợi thế trong sản xuất do độ ổn định của nó trong nước. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể là mạch nhánh hoặc không phân nhánh. Số polyme được gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu có nhiều hơn một polyme được gắn, chúng có thể là phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Nói chung, số và/hoặc loại polyme được sử dụng để dẫn xuất hóa có thể được xác định dựa trên việc xem xét bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể được cải thiện, xem liệu dẫn xuất kháng thể sẽ được sử dụng trong trị liệu trong các điều kiện được xác định, v.v..

Theo phương án khác, sáng chế đề xuất thể liên hợp của kháng thể và gốc không có protein có thể được gia nhiệt chọn lọc bằng cách tiếp xúc với phóng xạ. Theo một phương án, gốc không có protein là ống nano cacbon (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Phóng xạ có thể ở bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bước sóng không gây hại các tế bào bình thường, nhưng gia nhiệt gốc không có protein đến nhiệt độ ở đó các tế bào gần với gốc kháng thể không có protein bị giết.

B. Phương pháp và chế phẩm tái tổ hợp

Kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp và chế phẩm tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong US 4,816,567. Theo một phương án, sáng chế đề xuất axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể kháng CD19 ở người được mô tả trong bản mô tả này. Axit nucleic này có thể mã hóa trình tự axit amin bao gồm trình tự VL và/hoặc

axit amin bao gồm VH của kháng thể (ví dụ, chuỗi nhẹ và/hoặc chuỗi nặng của kháng thể). Theo phương án khác, sáng chế đề xuất một hoặc nhiều vector (ví dụ, vector biểu hiện) chứa axit nucleic này. Theo phương án khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ chứa axit nucleic này. Theo một phương án, tế bào chủ chứa (ví dụ, được biến nạp với): (1) vector chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và trình tự axit amin chứa VH của kháng thể, hoặc (2) vector thứ nhất chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VL của kháng thể và vector thứ hai chứa axit nucleic mã hóa trình tự axit amin chứa VH của kháng thể. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào có nhân điển hình, ví dụ tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO - Chinese Hamster Ovary) hoặc tế bào lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, sáng chế đề xuất phương pháp tạo ra kháng thể kháng CD19 ở người, trong đó phương pháp này bao gồm việc nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể, như được đề xuất ở trên, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể, và tùy ý khôi phục kháng thể từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể kháng CD19 ở người, axit nucleic mã hóa kháng thể, ví dụ, như được mô tả ở trên, được phân lập và được chèn vào một hoặc nhiều vector để nhân dòng và/hoặc biểu hiện trong tế bào chủ. Axit nucleic này có thể sẵn sàng được phân lập và giải trình tự bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng đoạn mồi oligonucleotit mà có thể liên kết cụ thể vào gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Tế bào chủ thích hợp để nhân dòng hoặc biểu hiện vector mã hóa kháng thể bao gồm tế bào không nhân hoặc tế bào có nhân điển hình được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, kháng thể có thể được tạo ra trong vi khuẩn, cụ thể khi sự glycosyl hóa và chức năng tác động Fc không được yêu cầu. Để biểu hiện các mảnh kháng thể và polypeptit trong vi khuẩn, xem, ví dụ, US 5,648,237, US 5,789,199, và US 5,840,523. (cũng xem Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), các trang 245-254, mô tả biểu hiện của các mảnh kháng thể trong *E. coli*.) Sau khi biểu hiện, kháng thể này có thể được phân lập từ hồ tế bào vi khuẩn trong một phần hòa tan và có thể được tinh chế thêm.

Ngoài tế bào không nhân, vi khuẩn có tế bào có nhân điển hình như nấm sợi hoặc men thích hợp để nhân dòng hoặc biểu hiện vật chủ cho vector mã hóa kháng thể, bao

gồm các chủng nấm và men mà con đường glycosyl hóa của chúng “được làm giống người,” dẫn đến sự sản sinh kháng thể có kiểu glycosyl hóa một phần hoặc đầy đủ ở người. Xem Gerngross, T.U., Nat. Biotech. 22 (2004) 1409-1414; và Li, H. và các đồng tác giả, Nat. Biotech. 24 (2006) 210-215.

Tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể được glycosyl hóa cũng thu được từ các sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về các tế bào động vật không xương sống bao gồm các tế bào thực vật và côn trùng. Nhiều chủng baculovirut được xác định có thể được sử dụng kết hợp với các tế bào côn trùng, cụ thể để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các môi trường nuôi cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem, ví dụ, US 5,959,177, US 6,040,498, US 6,420,548, US 7,125,978, và US 6,417,429 (mô tả công nghệ PLANTIBODY™ để sản xuất kháng thể trong thực vật chuyển gen).

Các tế bào động vật có xương sống cũng có thể sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, dòng tế bào động vật có vú được điều chỉnh để phát triển trong huyền phù có thể là hữu ích. Các ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bởi SV40 (COS-7); dòng thận phôi người (các tế bào 293 hoặc 293 như được mô tả, ví dụ, trong Graham, F.L. và các đồng tác giả, J. Gen Virol. 36 (1977) 59-74); các tế bào thận chuột đồng con (BHK); các tế bào sertoli ở chuột nhắt (các tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong Mather, J.P., Biol. Reprod. 23 (1980) 243-252); các tế bào thận khỉ (CV1); các tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76); các tế bào ung thư cổ tử cung ở người (HELA); các tế bào thận chó (MDCK; các tế bào gan chuột cống buffalo (BRL 3A); các tế bào phôi người (W138); các tế bào gan người (Hep G2); khối u vú chuột nhắt (MMT 060562); các tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong Mather, J.P. và các đồng tác giả, Annals N.Y. Acad. Sci. 383 (1982) 44-68; các tế bào MRC 5; và các tế bào FS4. Dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm các tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm các tế bào DHFR⁻ CHO (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); và dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để xem xét dòng tế bào vật chủ động vật có vú nhất định thích hợp để sản xuất kháng thể, xem, ví dụ, Yazaki, P. và Wu, A.M., Methods in Molecular

Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), các trang 255-268.

C. Thử nghiệm

Kháng thể kháng CD19 ở người được mô tả trong bản mô tả này có thể được xác định, được sàng lọc, hoặc được đặc trưng bởi các tính chất vật lý/hóa học của chúng và/hoặc hoạt tính sinh học bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật.

1. Các thử nghiệm liên kết và các thử nghiệm khác

Theo một khía cạnh, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này được kiểm tra về hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết như ELISA, thâm tách Western, v.v..

2. Các thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất các thử nghiệm để xác định kháng thể kháng CD19 ở người của nó có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, ức chế sự tăng sinh tế bào B hoặc giết tế bào B. Sáng chế đề xuất kháng thể có hoạt tính sinh học in vivo và/hoặc in vitro.

Theo các phương án nhất định, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này được kiểm tra hoạt tính sinh học này.

D. Thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế đề xuất thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này được liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như chất hóa trị hoặc dược chất, chất ức chế sinh trưởng, độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố có hoạt tính enzym của vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật nguồn gốc, hoặc mảnh của nó), hoặc các đồng vị phóng xạ.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch là thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) trong đó kháng thể được liên hợp với một hoặc nhiều thuốc, bao gồm nhưng không giới hạn ở, maytansinot (xem US 5,208,020, US 5,416,064 và EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc dược chất monomethyl auristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem US 5,635,483, US 5,780,588, và US 7,498,298); dolastatin; calicheamixin hoặc

dẫn xuất của nó (xem US 5,712,374, US 5,714,586, US 5,739,116, US 5,767,285, US 5,770,701, US 5,770,710, US 5,773,001, và US 5,877,296; Hinman, L.M. và các đồng tác giả, *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342; và Lode, H.N. và các đồng tác giả, *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928); anthracyclin như daunomyxin hoặc doxorubixin (xem Kratz, F. et al., *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523; Jeffrey, S.C. và các đồng tác giả, *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362; Torgov, M.Y. và các đồng tác giả, *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721; Nagy, A. và các đồng tác giả, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834; Dubowchik, G.M. và các đồng tác giả, *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532; King, H.D. và các đồng tác giả, *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343; và US 6,630,579); methotrexat; vindesin; taxan như doxetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothexen; và CC1065.

Theo phương án khác, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này được liên hợp với độc tố có hoạt tính enzym hoặc mảnh của nó, bao gồm nhưng không giới hạn ở, chuỗi bệnh bạch hầu A, các mảnh của độc tố bệnh bạch hầu có hoạt tính không liên kết, chuỗi exotoxin A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modeccin A, alpha-sarcin, protein *Aleurites fordii*, protein dianthin, protein *Phytolaca americana* (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế *momordica charantia*, curcin, crotin, chất ức chế *sapaonaria officinalis*, gelonin, mitogelin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và tricothexen.

Theo phương án khác, thể liên hợp miễn dịch bao gồm kháng thể như được mô tả trong bản mô tả này liên hợp với nguyên tử phóng xạ để tạo ra thể liên hợp phóng xạ. Một loạt các đồng vị phóng xạ có sẵn để sản xuất thể liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² và các đồng vị phóng xạ của Lu. Khi thể liên hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm nguyên tử phóng xạ để nghiên cứu xạ hình, ví dụ TC^{99m} hoặc I¹²³, hoặc đánh dấu quay cho hình ảnh cộng hưởng từ hạt nhân (NMR - nuclear magnetic resonance) (cũng được biết là hình ảnh cộng hưởng từ, MRI), như iot-123 lần nữa, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Thể liên hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra bằng cách sử dụng một loạt chất kết cặp protein hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat

(SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este có hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), dẫn xuất bis-diazonium (như bis-(p-diazoniumbenzoyl)-etylendiamin), diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất có hoạt tính bis-flo (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, chất độc miễn dịch rixin có thể được chuẩn bị như được mô tả trong Vitetta, E.S. và các đồng tác giả, Science 238 (1987) 1098-1104. Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triamin pentaaxetic được đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat tiêu biểu để liên hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO 94/11026. Liên kết này có thể là “liên kết có thể tách ra” tạo điều kiện dễ dàng cho việc giải phóng được chất gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, liên kết không bền với axit, liên kết nhạy với peptidaza, liên kết không bền do quang, liên kết dimetyl hoặc liên kết chứa disulfua (Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5,208,020) có thể được sử dụng.

Thể liên hợp miễn dịch hoặc ADC trong bản mô tả này biểu hiện dự định, nhưng không giới hạn ở, các thể liên hợp được chuẩn bị bằng các thuốc thử liên kết ngang bao gồm, nhưng không giới hạn ở, 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 (suxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) có thể mua được trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

E. Phương pháp và chế phẩm dùng để chẩn đoán và phát hiện

Theo các phương án nhất định, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD19 ở người được đề xuất trong bản mô tả này là hữu ích để phát hiện sự có mặt của các tế bào CD19 ở người trong mẫu sinh học. Thuật ngữ “phát hiện” như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm phát hiện định lượng hoặc định tính. Theo các phương án nhất định, mẫu sinh học bao gồm tế bào hoặc mô, như ví dụ máu, huyết thanh trong máu, hoặc huyết tương trong máu.

Theo một phương án, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện. Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp phát hiện sự có mặt của các tế bào thể hiện CD19 ở người trong mẫu sinh học. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh

học tiếp xúc với kháng thể kháng CD19 ở người như được mô tả trong bản mô tả này dưới các điều kiện cho phép để liên kết kháng thể kháng CD19 ở người với CD19 ở người, và phát hiện xem liệu phức chất có được tạo ra giữa kháng thể kháng CD19 ở người và CD19 ở người hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, kháng thể kháng CD19 ở người được sử dụng để chọn lọc đối tượng đủ điều kiện cho liệu pháp với kháng thể kháng CD19 ở người, ví dụ CD19 ở người là chỉ thị sinh học để chọn lọc bệnh nhân.

Các rối loạn tiêu biểu có thể được chẩn đoán bằng cách sử dụng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này bao gồm ung thư tế bào B, như u lympho tế bào B và bệnh bạch cầu tế bào B ngoại trừ đa u tủy, ví dụ u lympho không Hodgkin và bệnh bạch cầu lympho cấp tính.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người được đánh dấu. Nhãn bao gồm, nhưng không giới hạn ở, nhãn hoặc các gốc được phát hiện trực tiếp (như nhãn huỳnh quang, nhóm mang màu, điện tử dày đặc, sự phát quang hóa học, và các nhãn đánh dấu phóng xạ), cũng như các gốc, như enzym hoặc phối tử, mà được phát hiện gián tiếp, ví dụ, qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các nhãn tiêu biểu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đồng vị phóng xạ ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , và ^{131}I , nhóm huỳnh quang như chelat đất hiếm hoặc florescein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn xuất của nó, dansyl, umbeliferon, luciferaza, ví dụ, luciferaza đom đóm và luciferaza vi khuẩn (US 4,737,456), luciferin, 2,3-dihydroptalazindion, peroxidaza cải ngựa (HRP), alkaline phosphatase, β -galactosidase, glucoamylase, lysozyme, saccharine oxidase, ví dụ, glucoza oxidase, galactose oxidase, và glucoza-6-phosphat dehydrogenase, oxidase dị vòng như uricase và xanthine oxidase, kết cặp với enzym sử dụng hydro peroxide để oxy hóa tiền chất khô như HRP, lactoperoxidase, hoặc microperoxidase, biotin/avidin, đánh dấu quay, đánh dấu thể thực khuẩn, gốc tự do ổn định, và các chất tương tự.

F. Chế phẩm thuốc

Chế phẩm thuốc của kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này được bào chế bằng cách trộn kháng thể có độ tinh khiết mong muốn có một hoặc nhiều chất mang được dùng tùy chọn (Remington's Pharmaceutical Sciences, tái bản lần thứ 16, Osol, A. (ed.) (1980)), ở dạng chế phẩm được làm khô lạnh hoặc dung dịch dạng

nước. Chất mang được dụng thường không độc đối với người nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như octadexyl dimethylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc benzylic; alkyl paraben như methyl hoặc propyl paraben; catechol; resorcinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như poly(vinylpyrrolidon); axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; monosacarit, disacarit, và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza, hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion trái dấu tạo thành muối như natri; các phức chất kim loại (ví dụ các phức chất Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Chất mang được dụng tiêu biểu trong bản mô tả này còn bao gồm các chất phân tán thuốc trong ruột như enzym glycoprotein hyaluronidaza có hoạt tính trung hòa tan được (sHASEGP), ví dụ, glycoprotein PH-20 hyaluronidaza ở người tan được, như rhuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). sHASEGPs nhất định tiêu biểu và phương pháp sử dụng, bao gồm rhuPH20, như được mô tả trong US 2005/0260186 và US 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza khác như chondroitinaza.

Dạng chế phẩm kháng thể được làm khô lạnh tiêu biểu như được mô tả trong US 6,267,958. Dạng chế phẩm kháng thể dạng nước bao gồm các dạng chế phẩm được mô tả trong US 6,171,586 và WO 2006/044908, dạng chế phẩm sau đó bao gồm chất đệm histidin-axetat.

Dạng chế phẩm trong bản mô tả này có thể cũng chứa nhiều hơn một thành phần có hoạt tính là cần thiết cho chỉ dẫn cụ thể được điều trị, tốt hơn là các dạng chế phẩm có các hoạt động bổ sung mà không ảnh hưởng bất lợi đến nhau. Thành phần có hoạt tính này có mặt thích hợp kết hợp với lượng hiệu quả cho mục đích được dự định.

Thành phần có hoạt tính có thể bị bấy trong vi nang được chuẩn bị, ví dụ, bằng các kỹ thuật hình thành giọt tụ hoặc bằng sự polyme hóa giữa hai mặt, ví dụ, hydroxymethylxenluloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metyl metacrylat), tương

ứng, trong hệ phân phối thuốc keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, các hạt nano và viên nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật này được bộc lộ trong Remington's Pharmaceutical Sciences, tái bản lần thứ 16, Osol, A. (ed.) (1980).

Chế phẩm giải phóng ổn định có thể được điều chế. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng ổn định bao gồm chất nền bán thấm thấu của polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể, chất nền ở dạng các hạt có hình dạng, ví dụ màng, hoặc vi nang.

Dạng chế phẩm được sử dụng để dùng *in vivo* thường vô trùng. Vô trùng có thể được thực hiện một cách dễ dàng, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng.

G. Phương pháp điều trị và Chế phẩm

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD19 ở người được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng phương pháp điều trị, một mình hoặc kết hợp, như kháng thể đơn hiệu hoặc kháng thể đa đặc hiệu.

CD19 được biểu hiện trên hầu hết các tế bào B (chỉ thị tế bào pan B) ngoại trừ các tế bào gốc và các tế bào huyết tương, và thường được biểu hiện trên hầu hết tế bào B ác tính ở người (kháng nguyên liên kết khối u), như u lympho và bệnh bạch cầu ngoại trừ đa u tủy, ví dụ trong u lympho không phải Hodgkin và bệnh bạch cầu lympho cấp tính.

Kháng thể đặc hiệu kép nhận diện hai protein bề mặt tế bào trên tập hợp tế bào khác nhau có tiềm năng làm chuyển hướng các tế bào miễn dịch độc tế bào để phá hủy các tế bào đích gây bệnh.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, kháng thể kháng CD19 ở người được sử dụng để điều trị ung thư tế bào B. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người để sử dụng trong phương pháp điều trị cá thể mắc ung thư tế bào B bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng CD19 ở người. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của ít nhất một chất điều trị khác. Theo các phương án khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người để sử dụng để làm tiêu tế bào B. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở

người để sử dụng trong phương pháp làm tiêu tế bào B trong cá thể bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng CD19 ở người để làm tiêu tế bào B. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên tốt hơn là người. Theo một phương án, ung thư tế bào B là u lympho tế bào B hoặc bệnh bạch cầu tế bào B. Theo một phương án, ung thư tế bào B là u lympho không phải Hodgkin hoặc bệnh bạch cầu lympho cấp tính.

Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người để sử dụng trong ung thư liệu pháp miễn dịch. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề xuất kháng thể kháng CD19 ở người để sử dụng trong phương pháp của liệu pháp miễn dịch ung thư. “Cá thể” theo phương án bất kỳ ở trên tốt hơn là người.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể kháng CD19 ở người để sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, sáng chế đề xuất thuốc để điều trị ung thư tế bào B. Theo phương án khác, thuốc để sử dụng trong phương pháp điều trị ung thư tế bào B, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể mắc ung thư tế bào B dùng một lượng hữu hiệu của thuốc. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của ít nhất một chất điều trị khác, ví dụ, như được mô tả dưới đây. Theo phương án khác, thuốc này để làm tiêu tế bào B. Theo phương án khác, thuốc này để sử dụng trong phương pháp làm tiêu tế bào B ở cá thể bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của thuốc để làm tiêu tế bào B. “Cá thể” theo phương án bất kỳ ở trên có thể là người. Theo một phương án, ung thư tế bào B là u lympho tế bào B hoặc bệnh bạch cầu tế bào B. Theo một phương án, ung thư tế bào B là u lympho không phải Hodgkin hoặc bệnh bạch cầu lympho cấp tính.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp để điều trị ung thư tế bào B. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể mắc ung thư tế bào B dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng CD19 ở người. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của ít nhất một chất điều trị khác, như được mô tả dưới đây. “Cá thể” theo phương án bất kỳ ở trên có thể là người. Theo một phương án, ung thư tế bào B là u lympho tế bào B hoặc bệnh bạch cầu tế bào B. Theo một phương án, ung thư tế bào B là u lympho không phải Hodgkin hoặc bệnh bạch cầu lympho cấp tính.

Theo khía cạnh khác, sáng chế mô tả phương pháp để làm tiêu tế bào B trong cá thể. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng CD19 ở người để làm tiêu tế bào B. Theo một phương án, “cá thể” là người. Theo một phương án, ung thư tế bào B là u lympho tế bào B hoặc bệnh bạch cầu tế bào B. Theo một phương án, ung thư tế bào B là u lympho không phải Hodgkin hoặc bệnh bạch cầu lympho cấp tính.

Theo khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm thuốc chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp điều trị ở trên. Theo một phương án, chế phẩm thuốc chứa kháng thể kháng CD19 ở người bất kỳ như được nêu trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo phương án khác, chế phẩm thuốc chứa kháng thể kháng CD19 ở người bất kỳ như được nêu trong bản mô tả này và ít nhất một chất điều trị khác.

Kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất khác trong trị liệu. Trong trường hợp này, kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có thể được dùng đồng thời với ít nhất một chất điều trị khác.

Các liệu pháp kết hợp được lưu ý ở trên bao gồm việc dùng kết hợp (hai hoặc nhiều chất điều trị chứa trong các dạng chế phẩm giống nhau hoặc riêng rẽ), và dùng riêng rẽ, trong trường hợp này, việc dùng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này có thể xảy ra trước đó, đồng thời, và/hoặc sau khi dùng chất điều trị hoặc chất khác. Theo một phương án, việc dùng của kháng thể kháng CD19 ở người và việc dùng chất điều trị khác xảy ra trong khoảng một tháng, hoặc trong khoảng một, hai hoặc ba tuần, hoặc trong khoảng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày, với nhau.

Kháng thể như được nêu trong bản mô tả này (và bất kỳ chất điều trị khác) có thể được dùng bằng cách thích hợp bất kỳ, bao gồm ngoài đường tiêu hóa, phổi, và trong mũi, và, nếu mong muốn để điều trị cục bộ, trong thương tổn. Sự truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng, hoặc dùng dưới da. Việc dùng liệu có thể bằng đường thích hợp bất kỳ, ví dụ bằng cách tiêm, như tiêm trong tĩnh mạch hoặc dưới da, một phần phụ thuộc vào việc dùng là ngắn hoặc dài. Việc định lượng khác nhau bao gồm nhưng không giới hạn ở, một hoặc nhiều lần

dùng theo từng thời điểm khác nhau, việc dùng liều lớn, và truyền theo xung được dự định trong bản mô tả này.

Kháng thể như được nêu trong bản mô tả này sẽ được bào chế, định lượng liều, và được dùng theo cách thức phù hợp với thực tiễn y học. Các yếu tố để xem xét trong hoàn cảnh này bao gồm cụ thể rối loạn được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng bệnh lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân của rối loạn, vị trí phân phối của chất, phương pháp dùng, lịch trình dùng, và các yếu tố đã biết khác đối với bác sĩ thực hành y học. Kháng thể không được yêu cầu, nhưng tùy ý được bào chế bằng một hoặc nhiều chất hiện đang được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đang nghiên cứu. Lượng hữu hiệu của các chất khác này phụ thuộc lượng kháng thể có mặt trong dạng chế phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được thảo luận ở trên. Các chất này thường được sử dụng với liều lượng giống nhau và với đường dùng như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc nằm trong khoảng từ 1 đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả này, hoặc với liều bất kỳ và bằng đường bất kỳ mà được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là thích hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng kháng thể thích hợp như được nêu trong bản mô tả này (khi được sử dụng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất điều trị khác) sẽ tùy thuộc loại bệnh được điều trị, loại kháng thể, mức độ nghiêm trọng và giai đoạn của bệnh xem liệu kháng thể này được dùng cho mục đích ngăn ngừa hay điều trị, liệu pháp trước đây, lịch sử lâm sàng của bệnh nhân và đáp ứng với kháng thể, và ý kiến của bác sĩ theo dõi. Kháng thể thích hợp được dùng cho bệnh nhân ở một thời điểm hoặc trong một loạt điều trị. Tùy thuộc vào loại và mức độ nghiêm trọng của bệnh, khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 15 mg/kg (ví dụ 0,5 mg/kg - 10 mg/kg) kháng thể có thể là liều lượng đề xuất ban đầu để dùng cho bệnh nhân, ví dụ, bằng một hoặc nhiều lần dùng riêng rẽ, hoặc bằng cách truyền liên tục. Một liều hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ khoảng 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc cao hơn, tùy thuộc vào các yếu tố được đề cập ở trên. Đối với việc dùng lặp lại qua nhiều ngày hoặc lâu hơn, tùy thuộc vào tình trạng bệnh, việc điều trị sẽ thường được duy trì cho đến khi ức chế mong muốn các triệu chứng bệnh xảy ra. Một liều lượng tiêu biểu của kháng thể sẽ nằm trong khoảng từ khoảng 0,05 mg/kg đến khoảng 10 mg/kg . Do đó, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 4,0 mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc sự kết hợp bất kỳ của nó) có thể được dùng cho bệnh nhân. Các liều này có thể được dùng không liên tục, ví dụ mỗi tuần hoặc cứ

ba tuần một lần (ví dụ sao cho bệnh nhân nhận từ khoảng hai đến khoảng hai mươi, hoặc ví dụ khoảng sáu liều kháng thể). Liều tải nạp cao hơn ban đầu, tiếp đó có thể dùng một hoặc nhiều liều thấp hơn. Tuy nhiên, chế độ liều khác có thể hữu ích. Tiến trình của liệu pháp này được theo dõi một cách dễ dàng bởi các kỹ thuật và các thử nghiệm thông thường.

Sáng chế còn mô tả các phương pháp điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, và bệnh về xương, bao gồm việc cho bệnh nhân được chẩn đoán mắc bệnh này dùng (và do đó cần liệu pháp này) kháng thể tính đặc hiệu liên kết với CD19 ở người như được nêu trong bản mô tả này. Kháng thể có thể được dùng một mình, trong dược phẩm, hoặc theo cách khác được dùng kết hợp với thuốc khác để điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Kháng thể này được dùng với lượng cho hiệu quả được học.

Sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến hoặc bệnh về xương, và để bào chế dược phẩm chứa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này. Ngoài ra, sáng chế đề xuất phương pháp để bào chế dược phẩm chứa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này.

Sáng chế đề xuất kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương.

Sáng chế mô tả việc sử dụng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để bào chế dược phẩm để điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Kháng thể được sử dụng lượng cho hiệu quả được.

Sáng chế còn mô tả việc sử dụng kháng thể như được nêu trong bản mô tả này để bào chế dược phẩm để điều trị bệnh viêm, bệnh tự miễn, viêm khớp dạng thấp, luput, bệnh vẩy nến, hoặc bệnh về xương. Kháng thể được sử dụng với lượng cho hiệu quả được dùng.

Cần hiểu rằng dạng chế phẩm bất kỳ trong số các dạng chế phẩm nêu trên hoặc phương pháp điều trị ở trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch như được nêu trong bản mô tả này thay cho hoặc ngoài kháng thể kháng CD19 ở người.

III. Vật phẩm

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật phẩm chứa nguyên liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán của các rối loạn được mô tả ở trên. Vật phẩm bao gồm vật chứa và nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng ở trên hoặc đi kèm với vật chứa. Vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ nhỏ, ống tiêm, túi dung dịch IV, v.v.. Vật chứa có thể được tạo ra từ một loạt nguyên liệu như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa chứa chính chế phẩm hoặc được kết hợp với chế phẩm khác có hiệu quả để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh và có thể có đường vào vô trùng (ví dụ vật chứa này có thể là túi dung dịch trong tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có nắp có thể xuyên qua được bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một chất có hoạt tính trong chế phẩm là kháng thể như được nêu trong bản mô tả này. Nhãn hoặc hướng dẫn sử dụng chỉ ra chế phẩm được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lựa chọn. Hơn nữa, vật phẩm có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm chứa kháng thể như được nêu trong bản mô tả này; và (b) vật chứa thứ hai có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm chứa thêm chất gây độc tế bào hoặc nếu không thì chất điều trị. Vật phẩm theo phương án này có thể còn bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng chỉ ra chế phẩm có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm có thể còn bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa chất đệm được dụng, như nước kim hãm vi khuẩn để tiêm (BWFI), nước muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn chứa nguyên liệu khác mong muốn từ quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm chất đệm khác, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm, và ống tiêm.

Cần hiểu rằng vật phẩm bất kỳ trong số các vật phẩm nêu trên có thể bao gồm thể liên hợp miễn dịch như được nêu trong bản mô tả này thay cho hoặc ngoài kháng thể kháng CD19 ở người.

IV. Mô tả danh mục trình tự

SEQ ID NO: 1 miễn biến đổi chuỗi nặng kháng thể 8B8 ở chuột kháng CD19 ở người

SEQ ID NO: 2 miễn biến đổi chuỗi nhẹ kháng thể 8B8 ở chuột kháng CD19 ở người

SEQ ID NO: 3 kháng thể 8B8 HVR-H1 ở chuột kháng CD19 ở người

SEQ ID NO: 4 kháng thể 8B8 HVR-H2 ở chuột kháng CD19 ở người

SEQ ID NO: 5 kháng thể 8B8 HVR-H3 ở chuột kháng CD19 ở người SEQ

ID NO: 6 kháng thể 8B8 HVR-L1 ở chuột kháng CD19 ở người

SEQ ID NO: 7 kháng thể 8B8 HVR-L2 ở chuột kháng CD19 ở người

SEQ ID NO: 8 kháng thể 8B8 HVR-L3 ở chuột kháng CD19 ở người

SEQ ID NO: 9 miễn biến đổi chuỗi nặng được làm giống người

SEQ ID NO: 10-28 thay đổi trình tự của biến thể miễn biến đổi chuỗi nhẹ được làm giống người và biến thể HVR-L1 được làm giống người

V. Danh mục kháng thể

kháng thể hoặc vùng biến đổi kháng thể	số trình tự							
	Miễn biến đổi chuỗi nặng (VH)	miễn biến đổi chuỗi nhẹ (VL)	HVR-H1	HVR-H2	HVR-H3	HVR-L1	HVR-L2	HVR-L3
0:wt	1	2	3	4	5	6	7	8
1:N27dH	9	10	3	11	5	12	7	8
2:N27dQ	9	13	3	11	5	14	7	8
3:S27eA	9	15	3	11	5	16	7	8
4:S27eV	9	17	3	11	5	18	7	8
5:S27eP	9	19	3	11	5	20	7	8
6:N28Q	9	21	3	11	5	22	7	8
7:G29A	9	23	3	11	5	24	7	8
8:G29V	9	25	3	11	5	26	7	8
9:S27eP N28S	9	27	3	11	5	28	7	8

Ví dụ thực hiện sáng chế

Các ví dụ dưới đây là các ví dụ về các phương pháp và chế phẩm của sáng chế. Cần hiểu rằng các phương án khác nhau có thể được thực hiện, với mô tả chung được nêu trên.

Mặc dù sáng chế trên được mô tả chi tiết bằng cách minh họa và ví dụ cho mục đích rõ ràng để hiểu, phần mô tả và các ví dụ không được hiểu là hạn chế phạm vi của sáng chế. Việc bộc lộ tất cả các sáng chế và tài liệu khoa học được trích dẫn trong bản mô tả này được đưa vào đây bằng cách viện dẫn.

Ví dụ 1

Tạo miễn dịch và tạo ra kháng thể ở chuột kháng CD19 ở người (thể lai)

Chuột nhắt Balb/c được tạo miễn dịch sáu lần và được làm tăng bằng các tế bào HEK293 bị nhiễm CD19 (mật độ thụ thể trung bình 35.000 mỗi tế bào). Đáp ứng miễn dịch được theo dõi bằng cách kiểm tra các mẫu huyết thanh bằng tế bào ELISA CD19 trên các tế bào NIH-3T3 bị nhiễm CD19 ở người. Các tế bào lá lách từ chuột nhắt có độ chuẩn của kháng thể kháng CD19 ở người đủ được sử dụng để làm bất động bằng cách dung hợp với dòng tế bào u tủy ở chuột nhắt P3X63 Ag8.653. Ba dạng dung hợp được thực hiện và dịch nổi thể lai được sàng lọc bởi tế bào ELISA trên các tế bào NIH-3T3 bị nhiễm CD19 ở người và thử nghiệm liên kết FACS bằng cách sử dụng các tế bào Daudi (CD19⁺) và CD19⁻ đối với kháng thể đặc hiệu kháng CD19 ở người.

Ví dụ 2

Sàng lọc thể lai và đánh giá chức năng sinh học tế bào của kháng thể kháng CD19

Tế bào ELISA để sàng lọc kháng thể kháng hCD19

Tế bào ELISA được áp dụng để sàng lọc thể lai, và để xác định các thể lai tiết ra kháng thể kháng CD19 ở người. Các tế bào NIH3T3 bị nhiễm CD19 ở người được sử dụng làm các tế bào đối chứng dương; các tế bào NIH3T3 không bị nhiễm được sử dụng làm các tế bào đối chứng âm. Để đánh giá các thể lai làm đối chứng dương tỷ lệ OD giữa các tế bào NIH3T3 bị nhiễm và không bị nhiễm được định lượng.

- Môi trường nuôi cấy: DMEM glucoza cao (4,5 mg/ml), 10% FCS, Na-Pyruvat, NEAA, Glutamin
- Kháng thể đối chứng dương: kháng thể đơn dòng kháng CD19 (IgG1) Pharmingen Cat# 555409 c = 1 mg/ml
- Kháng thể phát hiện: IgG kháng dê ở chuột nhắt (H+L) HRP liên hợp Bio-Rad Cat# 170-06516
- Pha loãng 1: 2000 trong 1x thuốc thử phong bế ELISA
- Các thuốc thử khác: Fibronectin Roche Cat# 838039 c = 1 mg/ml

– Glutardialdehyt: 25% dung dịch gốc // Grade Agar Scientific #R102 nồng độ cuối: 0,05% trong PBS

– Thuốc thử chặn ELISA: 10x dung dịch gốc // Roche Cat# 1112589

– Cơ chất TMB: Roche Cat# 11432559

– Dung dịch làm ngừng: 1 M H₂SO₄

– BioRad Cat# 170-6516 Pha loãng 1: 2000 trong 1x thuốc thử làm ngừng ELISA

Ngày 1:

– Lớp phủ Fibronectin: 5 µg/cm² trong PBS; tấm 96 lỗ = 32 cm²; 160 µg/tấm trong 6 ml

– PBS, 50 µl/lỗ

– ủ 45 phút ở nhiệt độ phòng, dung dịch phủ aspirat

– gieo 1,25 x 10⁴ tế bào/lỗ trong 50 µl môi trường nuôi cấy trong tấm 96 lỗ

– ủ 40 giờ ở nhiệt độ 37°C

– bổ sung vào nửa trên của đĩa: các tế bào NIH3T3 biểu hiện CD19

– bổ sung vào nửa dưới của đĩa: các tế bào NIH3T3 không bị nhiễm

Ngày 3:

– bổ sung kháng thể hoặc mẫu đối chứng dương (dịch nổi hoặc huyết thanh của chuột nhắt) trong 50 µl môi trường nuôi cấy

– ủ trong 2 giờ ở nhiệt độ 4°C

– loại bỏ môi trường, cố định các tế bào bằng 100 µl glutardialdehyt (0,05% trong PBS)

– Rửa hai lần bằng 200 µl PBS

– Bổ sung kháng thể phát hiện 1:2000, 50 µl/lỗ

– ủ 2 giờ ở nhiệt độ phòng

– rửa ba lần bằng 200 µl PBS

- bổ sung 50 μ l TMB, ủ trong 30 phút ở nhiệt độ phòng,
- dừng bằng cách bổ sung 25 μ l 1 M H_2SO_4 ; tắt đọc ở 450nm/620nm
- Tính toán kết quả: tỷ lệ không bị nhiễm OD NIH3T3 CD19 : OD NIH3T3

Ví dụ 3

Làm giống người kháng thể kháng CD19

Tính đặc hiệu liên kết CD19 của kháng thể chuột được chuyển vào trong khung làm việc chất nhận ở người để giảm thiểu mô sinh miễn dịch tiềm năng phát sinh từ trình tự kéo dài mà cơ thể người sẽ nhận diện là chất lạ. Điều này được thực hiện bằng cách ghép vùng xác định bổ thể nguyên vẹn (CDR – complementary determining region) của khung làm việc kháng thể ở chuột (đối tượng cho) vào khung làm việc kháng thể ở người (đối tượng nhận), và được gọi là ghép CDR hoặc người hóa kháng thể.

Trình tự axit amin ở chuột được sắp thẳng hàng với bộ sưu tập gen V kháng thể dòng mầm ở người, và được sàng lọc theo sự đồng nhất và tương đồng về trình tự. Trước khi chọn một trình tự nhận cụ thể, còn được gọi là cấu trúc vòng kiểu mẫu của kháng thể của đối tượng cho được xác định (Morea, V., et al., Methods, Vol 20, Issue 3 (2000) 267-279). Các cấu trúc vòng kiểu mẫu này được xác định bằng loại gốc có mặt ở các vị trí cũng gọi là kiểu mẫu. Các vị trí này nằm (một phần) ngoài vùng CDR, và phải được giữ chức năng tương đương trong cấu trúc cuối cùng để giữ được cấu dạng CDR của kháng thể bố mẹ (đối tượng cho). Trình tự dòng mầm ở người VBASE_VH1_1 được chọn làm đối tượng nhận cho chuỗi nặng và trình tự VBASE_VK2_5 được chọn cho chuỗi nhẹ. Quá trình này tạo ra kháng thể được làm giống người kiểu đại.

Ví dụ 4

Biểu hiện của kháng thể liên kết CD19

Trình tự mã hóa vùng biến đổi kháng thể được tạo ra bằng việc tổng hợp gen.

Để đưa các đột biến điểm tương ứng đoạn mỗi 33mer dựa trên phản ứng thay đổi nhanh được thực hiện. Tất cả trình tự đã được xác minh bằng trình tự (SequiServe, Vaterstetten, Germany). Tất cả trình tự được nhân dòng thành vector mà có thể chọn lọc và nhân lên trong E. coli (nguồn gốc sự sao chép từ vector pUC18, beta-lactamaza để kháng ampicilin). Các vector này còn chứa caxet có thể biểu hiện trong các tế bào động

vật có vú (nguồn gốc của sao chép, oriP, của virus Epstein - Barr (virus EBV - Epstein - Barr), chất tăng cường sớm ngay lập tức và gen khởi đầu từ cytomegalovirus ở người (HCMV) và trình tự polyadenyl hóa).

Tất cả các mảnh gen mã hóa cho chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của kháng thể được bắt đầu bằng trình tự AND mã hóa cho peptit tín hiệu (MGWSCIILFLVATATGVHS; SEQ ID NO: 29). Protein được biểu hiện bởi các tế bào HEK 293 thận phôi thai ở người chuyển nhiễm tạm thời trong huyền phù. Các tế bào này được nuôi cấy ở nhiệt độ 37°C và 8% CO₂. Vào ngày chuyển nhiễm, các tế bào được gieo trong môi trường sạch ở mật độ 1–2×10⁶ tế bào sống/mL. Lượng đẳng mol của cả hai ADN plasmit chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đồng chuyển nhiễm. Dịch nổi nuôi cấy tế bào được thu hoạch 7 ngày sau khi chuyển nhiễm, được ly tâm (140.000 m/s² trong 45 phút ở nhiệt độ 4°C), và sau đó được lọc qua bộ lọc 0,22-μm. Dịch nổi này có thể được làm đông lạnh và được giữ ở nhiệt độ -20°C trước khi tinh chế.

Ví dụ 5

Tinh chế kháng thể liên kết CD19

Phương pháp chung:

Dịch nổi lên men không tế bào (HEK 293F) được tải lên trên cột ái lực protein A được làm cân bằng trước (nước muối đệm phosphat, PBS) (MabSelectTMSuRe, GE Healthcare, 8x100mm) với thời gian tiếp xúc bằng 5 phút. Sau khi rửa (PBS, thể tích 5 cột) kháng thể được rửa giải bằng axit xitric 25 mM /NaOH (pH 3,0). Chất rửa giải được điều chỉnh đến pH 5,5 bằng 1 M Tris và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Sau đó, tiến hành bước lọc cuối cùng (0,45μm):

Tinh chế của kháng thể kháng CD19 ở người biến thể 5 (S27eP):

Dịch nổi lên men không tế bào (244 ml, HEK 293F) được tải lên trên cột ái lực protein A được làm cân bằng trước (nước muối đệm phosphat, PBS) (MabSelectTMSuRe, GE Healthcare, 8x100mm) với thời gian tiếp xúc là 5 phút. Sau khi rửa (PBS, 5 thể tích cột) kháng thể được rửa giải bằng 25 mM axit xitric /NaOH (pH 3,0). Chất rửa giải được điều chỉnh đến pH 5,5 bằng 1 M Tris và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Bước lọc cuối cùng (0,45μm) còn 31,1 mg (5,7 ml, 5,45 mg/ml) 99,0% (SEC) sản phẩm tinh chế.

Tinh chế của kháng thể kháng CD19 ở người biến thể 9 (S27eP/N28S):

Dịch nổi lên men không tế bào (260 ml, HEK 293F) được tải lên trên cột ái lực protein A được làm cân bằng trước (PBS) (MabSelect™SuRe, GE Healthcare, 8x100mm) với thời gian tiếp xúc bằng 5 phút. Sau khi rửa (PBS, 5 thể tích cột) protein đích được rửa giải bằng 25 mM axit xitric /NaOH (pH 3,0). Chất rửa giải được điều chỉnh đến pH 5,5 bằng 1 M Tris (pH 9,0) và được ủ qua đêm ở nhiệt độ 4°C. Bước lọc cuối cùng (0,2µm) còn 9,1 mg (5,2 ml, 1,75 mg/ml) 98,0% (SEC) sản phẩm tinh chế.

Ví dụ 6

Tạo ra các tế bào biểu hiện CD19 ECD và liên kết kháng thể từ đó

Các tế bào HEK293 được chuyển nhiễm 1 µg ADN plasmit cho mỗi $1,5 \times 10^6$ tế bào bằng cách sử dụng LipofectAmine 2000 và được ủ sau đó trong 48 giờ ở nhiệt độ 37°C. Plasmit mã hóa CD19 ở người (PEEPLVVKVE EGDNAVLQCL KGTS DGPTQQ LTWSRESPLK PFLKLSLGLP GLGIHMRPLA IWLFI FNVSQ QMGGFYLCQP GPPSEKAWQP GWTVNVEGSG ELFRWNVSDL GGLGCGLKNR SSEGPSSPSG KLMSPKLYVW AKDRPEIWEG EPPCLPPRDS LNQSLSQDLT MAPGSTLWLS CGVPPDSVSR GPLSWTHVHP KGPKSLLSLE LKDDRPARDM WVMETGLLLP RATAQDAGKY YCHRG NLTMS FHLEITARPV LWHWLLRTGG WK; SEQ ID NO: 30) hoặc CD19 ở khỉ cynomolgus (PQEPLVVKVE EGDNAVLQCL EGTS DGPTQQ LVWCRDSPFE PFLNLSLGLP GMGIRMGPLG IWLFI FNVSQ QTGGFYLCQP GLPSEKAWQP GWTVSVEGSG ELFRWNVSDL GGLGCGLKNR SSEGPSSPSG KLNSSQLYVW AKDRPEMWEG EPVCGPPRDS LNQSLSQDLT MAPGSTLWLS CGVPPDSVSR GPLSWTHVRP KGPKSSLLSL ELKDDRPDRD MWVVD TGLLL TRATAQDAGK YYCHRG NWTK SFYLEITARP ALWHWLLRIG GWKV; SEQ ID NO: 31) vùng ngoại bào (ECD) được dung hợp với trình tự neo PSCA GPI ở người (DTDLCNASGA HALQPAAAIL ALLPALGLLL WGP GQL; SEQ ID NO: 32) thể hiện ngoại bào. Các tế bào chuyển nhiễm tương ứng được rửa hai lần trong đệm FACS (PBS chứa huyết thanh thai bò 5% (FCS)) và được tái huyền phù trong đệm FACS đến nồng độ cuối bằng 2×10^6 tế bào/mL tương ứng với $5,0 \times 10^4$ tế bào/25 µL/lỗ. Nồng độ ban đầu của kháng thể được đặt đến 60 µg/mL (2x nồng độ cuối) và sau đó được pha loãng theo dãy chuẩn độ 1:3 (thể tích/thể tích). Kháng thể thứ cấp được ủ trên các tế bào trong một giờ ở nhiệt độ phòng, sau hai bước rửa. Để phát hiện thứ cấp, kháng thể kháng huIgG (H+L) liên

hợp với Alexa488 ở nồng độ bằng 30 $\mu\text{g/mL}$ được sử dụng. Kháng thể thứ cấp được ủ trong một giờ ở nhiệt độ phòng. Sau đó, các tế bào được rửa hai lần và được tái huyền phù trong 70 μL /lỗ đệm FACS và được phân tích bằng cách sử dụng BD FACS Canto.

Các giá trị EC_{50} tương ứng đối với kháng thể kiểu đại được làm giống người và các biến thể 5 (S27eP) và 9 (S27eP/M28S) được thể hiện trong Bảng dưới đây.

	wt [$\mu\text{g/mL}$]	biến thể 5 [$\mu\text{g/mL}$]	biến thể 9 [$\mu\text{g/mL}$]
CD19-ECD ở người	0,087	0,084	0,089
CD19-ECD ở khỉ cynomolgus	0,313	0,255	0,435

Ví dụ 7

Phổ khối (LC-MS/MS)

Nguyên liệu kháng thể (xấp xỉ 80 μg) được biến tính trong 200 mM đệm histidin-HCl (pH 6,0) chứa xấp xỉ 7 M Guanidin-HCl, được khử bằng cách sử dụng 10 mM TCEP, và đệm được chuyển thành 200 mM histidin-HCl (pH 6,0) bằng cách sử dụng Zeba Spin Columns 7K MWCO (Thermo Scientific). Cuối cùng, nguyên liệu này được tiêu hóa bằng 2,5 μg trypsin hoặc thermolysin (Promega) trong 16 giờ ở nhiệt độ 37°C. Việc thu thập dữ liệu được thực hiện bằng gradien RP-UPLC trên cột ACQUITY BEH300 C18 (Waters) bằng cách sử dụng hệ thống NanoAcquity UPLC (Waters) sau đó là CID dựa trên MS/MS trên phổ khối kế Orbitrap Fusion Tribrid (Thermo Scientific) với TriVersa NanoMate (Advion) như là nguồn ion hóa NanoElectrospray. Dữ liệu được đánh giá bằng cách sử dụng Mascot MS/MS Ion Searches (Matrix Science) và Peptide Analyzer (Roche Diagnostics GmbH), phần mềm đánh giá dữ liệu MS trong nhà. Việc định lượng được thực hiện bằng cách tích hợp sắc ký dòng ion được chiết của peptit tương ứng.

Kết quả:

Mức độ khử amit và tạo thành suxinimit khi ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 tuần ở độ pH=7,4 trong đệm PBS của kháng thể kháng CD19 kiểu đại được làm giống người (biến thể 0: wt) được thể hiện trong bảng dưới đây (mảnh được sử dụng: SSQSLENSNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR; SEQ ID NO: 35).

mẫu	dạng được khử amit [%]	tạo thành suxinimit [%]
tham chiếu	~8	0

được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 tuần ở độ pH=7,4 trong đệm PBS	26-32	0
---	-------	---

Mức độ khử amit và tạo thành suxinimit khi ủ biến thể 5 kháng thể kháng CD19 được làm giống người (S27eP) được thể hiện trong Bảng dưới đây (mảnh được sử dụng: SSQSLENPNNGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR; SEQ ID NO: 35).

mẫu	dạng được khử amit [%]	tạo thành suxinimit [%]
tham chiếu	2	2
được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 tuần ở độ pH=7,4 trong đệm PBS	7	0
được ủ ở nhiệt độ 40°C trong 2 tuần ở độ pH=6,0 trong histidin/đệm NaCl	4	2

Mức độ khử amit và tạo thành suxinimit khi ủ biến thể 3 kháng thể kháng CD19 được làm giống người (S27eA) được thể hiện trong Bảng dưới đây (mảnh được sử dụng: SSQSLENANGNTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR; SEQ ID NO: 35).

mẫu	dạng được khử amit [%]	tạo thành suxinimit [%]
tham chiếu	7	2
được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 tuần ở độ pH=7,4 trong đệm PBS	23	1
được ủ ở nhiệt độ 40°C trong 2 tuần ở độ pH=6,0 trong đệm histidin/NaCl	13	1

Mức độ khử amit và tạo thành suxinimit khi ủ biến thể 7 kháng thể kháng CD19 được làm giống người (G29A) được thể hiện trong bảng dưới đây (mảnh được sử dụng: SSQSLENSNANTYLNWYLQKPGQSPQLLIYR; SEQ ID NO: 35).

mẫu	dạng được khử amit [%]	tạo thành suxinimit [%]
tham chiếu	8	0
được ủ ở nhiệt độ 37°C trong 2 tuần ở độ pH=7,4 trong đệm PBS	45	0,5

được ủ ở nhiệt độ 40°C trong 2 tuần ở độ pH=6,0 trong đệm histidin/NaCl	13	0
---	----	---

Ví dụ 8

Xác định ái lực CD19

Thử nghiệm dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt (SPR) được sử dụng để xác định các thông số động lực học của liên kết giữa kháng thể kháng CD19 ở người và miền ngoại bào của thụ thể CD19 tái tổ hợp ở người.

Quy trình 1:

Để bắt giữ kháng thể kháng CD19 ở người mảnh kháng thể kháng người F(ab)'₂ làm kháng thể bắt giữ được sử dụng (Jackson Immuno Research; mã đặt hàng: 109-006-006). Kháng thể bắt giữ 20 µg/mL được làm bất động trên chip CM5 (GE Healthcare; BR-1005-30) ở độ pH 4,5 bằng cách sử dụng bộ kit amin kết cặp theo hướng dẫn của nhà sản xuất (GE Healthcare). Mẫu và đệm chạy là HBS-EP+ (GE Healthcare; BR-1006-69). Tế bào chảy được đặt ở nhiệt độ 25°C. Khối mẫu được cài đặt ở nhiệt độ 12°C. Cả hai được môi bằng đệm chạy. Kháng thể kháng CD19 ở người được bắt giữ bằng cách tiêm dung dịch 35 nM trong 60 giây ở tốc độ dòng 20 µL/phút. Liên kết được xác định bằng cách tiêm CD19 ECD tái tổ hợp ở người với nồng độ khác nhau trong dung dịch trong 120 giây ở tốc độ dòng là 50 µL/phút, bắt đầu bằng 900 nM theo tỷ lệ pha loãng 1:3 và tổng cộng năm nồng độ. Pha phân ly được theo dõi đến 600 giây và được kích hoạt bằng cách chuyển từ dung dịch mẫu đến đệm chạy. Bề mặt được tái tạo hai lần trong 60 giây và 30 giây, rửa bằng dung dịch glyxin 10 mM (pH 1,5) ở tốc độ dòng bằng 30 µL/phút. Sự chênh lệch hệ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi đáp ứng thu được từ bề mặt kháng F(ab)'₂ ở dê kháng người. Tiêm mẫu trống cũng được trừ (= tham khảo kép). Để tính toán KD rõ ràng và các thông số động lực khác mô hình Langmuir 1:1 được sử dụng.

Quy trình 2:

Để bắt giữ kháng thể kháng CD19 ở người kháng thể bắt giữ kháng Fab ở người được sử dụng. Đầu tiên 30 µg/mL kháng thể ở dê kháng Fab ở người (Mã đặt hàng: 28958325; GE Healthcare Bio-Sciences AB) được làm bất động trên chip CM5 (GE Healthcare; BR-1005-30) ở độ pH 5,0 bằng cách sử dụng bộ kit amin kết cặp (GE

Healthcare) theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Mẫu và đệm chạy là HBS-EP+ (GE Healthcare; BR-1006-69). Dòng tế bào được đặt ở nhiệt độ 25°C. Khối mẫu được cài đặt ở nhiệt độ 12°C. Cả hai được môi bằng đệm chạy. Kháng thể kháng CD19 ở người được bắt giữ bằng cách tiêm 10 nM dung dịch trong 60 giây ở tốc độ dòng bằng 10 $\mu\text{L}/\text{phút}$. Sự liên kết được xác định bằng cách tiêm CD19 ECD tái tổ hợp ở người trong 90 giây ở tốc độ dòng bằng 10 $\mu\text{L}/\text{phút}$ ở nồng độ 250 nM. Pha phân ly được theo dõi đến 60 giây và được kích hoạt bằng cách chuyển từ dung dịch mẫu đến đệm chạy. Bề mặt được tạo ra trong 60 giây rửa bằng 10 mM dung dịch glyxin (pH 2,1) ở tốc độ dòng bằng 10 $\mu\text{L}/\text{phút}$. Sự chênh lệch hệ số khúc xạ khối được hiệu chỉnh bằng cách trừ đi đáp ứng từ bề mặt mẫu trống.

Tính toán:

Liên kết tương đối của mẫu là tỷ lệ được tính toán từ mức bắt giữ và mức liên kết (liên kết RU được chia bởi bắt giữ RU):

$$\text{Liên kết tương đối} = \frac{\text{Mức liên kết}}{\text{Mức bắt giữ}}$$

Nồng độ có hoạt tính tương đối của mẫu là tỷ lệ của mẫu so với mẫu tham chiếu:

$$\text{Nồng độ có hoạt tính tương đối} = \frac{\text{Liên kết tương đối}_{\text{mẫu}}}{\text{Liên kết tương đối}_{\text{tham chiếu}}}$$

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người, trong đó kháng thể này chứa:
 - (a) HVR-H1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03,
 - (b) HVR-H2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 11,
 - (c) HVR-H3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 05,
 - (d) HVR-L1 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 hoặc 28,
 - (e) HVR-L2 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 07, và
 - (f) HVR-L3 chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 08.
2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó kháng thể này là kháng thể đơn dòng.
3. Kháng thể theo điểm 1 hoặc 2, trong đó kháng thể này là kháng thể ở người, được làm giống như của người hoặc kháng thể khảm.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là mảnh kháng thể mà gắn kết đặc hiệu với CD19 ở người.
5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể này chứa
 - (a) trình tự VH có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 09 ít nhất là 95% và trình tự VL có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19 ít nhất bằng 95%, hoặc
 - (b) trình tự VH có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 09 ít nhất là 95% và trình tự VL có độ tương đồng trình tự với trình tự axit amin của SEQ ID NO: 27 ít nhất là 95%, hoặc
 - (c) trình tự VH hoặc trình tự VL như trong (a) hoặc (b).
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 5, trong đó kháng thể này là kháng thể đa đặc hiệu.
7. Kháng thể theo điểm 6, trong đó kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép.
8. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7, trong đó kháng thể này là kháng thể hai hóa trị hoặc ba hóa trị.

9. Kháng thể theo điểm 8, trong đó kháng thể này là kháng thể hai hóa trị.
10. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 9 và chất mang được dụng.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> KHÁNG THỂ GẮN KẾT ĐẶC HIỆU VỚI CD19 Ở NGƯỜI ĐƯỢC LÀM GIỐNG NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> P33094

<150> EP15187820.4

<151> 2015-10-01

<160> 70

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1

<211> 121

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 1

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

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

Ile	Met	His	Trp	Val	Lys	Gln	Lys	Thr	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Ile
		35					40					45			

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

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

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

Ala	Arg	Gly	Thr	Tyr	Tyr	Tyr	Gly	Ser	Ala	Leu	Phe	Asp	Tyr	Trp	Gly
			100					105					110		

Gln	Gly	Thr	Thr	Leu	Thr	Val	Ser	Ser
		115					120	

<210> 2
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Mus musculus
 <400> 2

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

Asp Gln Ala Ser Ile Ser Cys Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 3
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 3

Asp Tyr Ile Met His
 1 5

<210> 4
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 4

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

Gly

<210> 5
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 5
 Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr
 1 5 10

<210> 6
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 6

Arg Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 7
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 7

Arg Val Ser Lys Arg Phe Ser
 1 5

<210> 8
 <211> 9
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 8

Leu Gln Leu Thr His Val Pro Tyr Thr
 1 5

<210> 9
 <211> 121

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> VH được làm giống người

<400> 9

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Gly Thr Tyr Tyr Tyr Gly Ser Ala Leu Phe Asp Tyr Trp Gly
 100 105 110

Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 10
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> N27dH VL

<400> 10

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

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

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

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

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

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

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

<210> 11
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> HVR-H2 được làm giống người
 <400> 11

Tyr Ile Asn Pro Tyr Asn Asp Gly Ser Lys Tyr Thr Glu Lys Phe Gln
 1 5 10 15

Gly

<210> 12
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> N27dH HVR-L1

<400> 12

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 13
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> N27dQ VL

<400> 13

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Gln Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 14
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> N27dQ HVR-L1

<400> 14

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Gln Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 15
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S27eA VH

<400> 15

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ala
 20 25 30

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

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

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

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

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

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

<220>
 <223> S27eA HVR-L1

<400> 16

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ala Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 17

<211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S27eV VL

<400> 17

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Val
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 18
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S27eV HVR-L1

<400> 18

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Val Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 19
 <211> 112

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S27eP VL

<400> 19

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 20
 <211> 16
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> S27eP HVR-L1

<400> 20

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 21
 <211> 112
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> N28Q VL

<400> 21

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 22

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> N28Q HVR-L1

<400> 22

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Gln Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 23

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> G29A VL

<400> 23

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 24

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> G29A HVR-L1

<400> 24

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Ala Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 25

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> G29V VL

<400> 25

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 26

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> G29V HVR-L1

<400> 26

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Val Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 27

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S27eP/N28S VH

<400> 27

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

Gln Pro Ala Ser Ile Ser Cys Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro
 20 25 30

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

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

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

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

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

<210> 28

<211> 16

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> S27eP/N28S HVR-L1

<400> 28

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Glu Asn Pro Ser Gly Asn Thr Tyr Leu Asn
 1 5 10 15

<210> 29

<211> 19

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> peptit tín hiệu

<400> 29

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

Val His Ser

<210> 30

<211> 272

<212> PRT

<213> Homo sapiens

<400> 30

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
 1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
 20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
 35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
 50 55 60

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

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
 85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
 195 200 205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
 210 215 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
 245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
 260 265 270

<210> 31
 <211> 274
 <212> PRT
 <213> Macaca fascicularis

<400> 31

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

Leu Gln Cys Leu Glu Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Val
 20 25 30

Trp Cys Arg Asp Ser Pro Phe Glu Pro Phe Leu Asn Leu Ser Leu Gly
 35 40 45

Leu Pro Gly Met Gly Ile Arg Met Gly Pro Leu Gly Ile Trp Leu Leu
 50 55 60

Ile Phe Asn Val Ser Asn Gln Thr Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
 65 70 75 80
 Gly Leu Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Ser Val
 85 90 95
 Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110
 Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125
 Ser Gly Lys Leu Asn Ser Ser Gln Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140
 Pro Glu Met Trp Glu Gly Glu Pro Val Cys Gly Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160
 Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175
 Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190
 Leu Ser Trp Thr His Val Arg Pro Lys Gly Pro Lys Ser Ser Leu Leu
 195 200 205
 Ser Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Asp Arg Asp Met Trp Val Val
 210 215 220
 Asp Thr Gly Leu Leu Leu Thr Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys
 225 230 235 240
 Tyr Tyr Cys His Arg Gly Asn Trp Thr Lys Ser Phe Tyr Leu Glu Ile
 245 250 255
 Thr Ala Arg Pro Ala Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Ile Gly Gly Trp
 260 265 270
 Lys Val

<210> 32
 <211> 36
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 32
 Asp Thr Asp Leu Cys Asn Ala Ser Gly Ala His Ala Leu Gln Pro Ala
 1 5 10 15
 Ala Ala Ile Leu Ala Leu Leu Pro Ala Leu Gly Leu Leu Leu Trp Gly
 20 25 30
 Pro Gly Gln Leu
 35

<210> 33
 <211> 537
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 33
 Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
 1 5 10 15
 Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
 20 25 30
 Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
 35 40 45
 Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
 50 55 60
 Ile Phe Asn Val Ser Gln Gln Met Gly Gly Phe Tyr Leu Cys Gln Pro
 65 70 75 80
 Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
 85 90 95
 Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190

Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
 195 200 205

Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
 210 215 220

Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
 225 230 235 240

Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
 245 250 255

Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
 260 265 270

Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu
 275 280 285

Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg Arg Lys Arg
 290 295 300

Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val Thr Pro Pro
 305 310 315 320

Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu Ser Leu Pro
 325 330 335

Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala Ala Gly Leu
 340 345 350

Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp Val Gln Ala
 355 360 365

Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly Pro Glu Glu
 370 375 380

Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu Asp Ser Glu
 385 390 395 400

Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu Ser Gln Asp
 405 410 415

Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly Pro Glu Asp
 420 425 430

Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu Asp Glu Glu
 435 440 445

Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser Pro His Gly
 450 455 460

Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Gly Ser Gln Ser
 465 470 475 480

Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Arg Ser
 485 490 495

Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala Asp Ser Tyr
 500 505 510

Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp Gly Gly Gly
 515 520 525

Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg

530

535

<210> 34
 <211> 538
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 34

Pro Glu Glu Pro Leu Val Val Lys Val Glu Glu Gly Asp Asn Ala Val
 1 5 10 15

Leu Gln Cys Leu Lys Gly Thr Ser Asp Gly Pro Thr Gln Gln Leu Thr
 20 25 30

Trp Ser Arg Glu Ser Pro Leu Lys Pro Phe Leu Lys Leu Ser Leu Gly
 35 40 45

Leu Pro Gly Leu Gly Ile His Met Arg Pro Leu Ala Ile Trp Leu Phe
 50 55 60

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

Gly Pro Pro Ser Glu Lys Ala Trp Gln Pro Gly Trp Thr Val Asn Val
 85 90 95

Glu Gly Ser Gly Glu Leu Phe Arg Trp Asn Val Ser Asp Leu Gly Gly
 100 105 110

Leu Gly Cys Gly Leu Lys Asn Arg Ser Ser Glu Gly Pro Ser Ser Pro
 115 120 125

Ser Gly Lys Leu Met Ser Pro Lys Leu Tyr Val Trp Ala Lys Asp Arg
 130 135 140

Pro Glu Ile Trp Glu Gly Glu Pro Pro Cys Leu Pro Pro Arg Asp Ser
 145 150 155 160

Leu Asn Gln Ser Leu Ser Gln Asp Leu Thr Met Ala Pro Gly Ser Thr
 165 170 175

Leu Trp Leu Ser Cys Gly Val Pro Pro Asp Ser Val Ser Arg Gly Pro
 180 185 190
 Leu Ser Trp Thr His Val His Pro Lys Gly Pro Lys Ser Leu Leu Ser
 195 200 205
 Leu Glu Leu Lys Asp Asp Arg Pro Ala Arg Asp Met Trp Val Met Glu
 210 215 220
 Thr Gly Leu Leu Leu Pro Arg Ala Thr Ala Gln Asp Ala Gly Lys Tyr
 225 230 235 240
 Tyr Cys His Arg Gly Asn Leu Thr Met Ser Phe His Leu Glu Ile Thr
 245 250 255
 Ala Arg Pro Val Leu Trp His Trp Leu Leu Arg Thr Gly Gly Trp Lys
 260 265 270
 Val Ser Ala Val Thr Leu Ala Tyr Leu Ile Phe Cys Leu Cys Ser Leu
 275 280 285
 Val Gly Ile Leu His Leu Gln Arg Ala Leu Val Leu Arg Arg Lys Arg
 290 295 300
 Lys Arg Met Thr Asp Pro Thr Arg Arg Phe Phe Lys Val Thr Pro Pro
 305 310 315 320
 Pro Gly Ser Gly Pro Gln Asn Gln Tyr Gly Asn Val Leu Ser Leu Pro
 325 330 335
 Thr Pro Thr Ser Gly Leu Gly Arg Ala Gln Arg Trp Ala Ala Gly Leu
 340 345 350
 Gly Gly Thr Ala Pro Ser Tyr Gly Asn Pro Ser Ser Asp Val Gln Ala
 355 360 365
 Asp Gly Ala Leu Gly Ser Arg Ser Pro Pro Gly Val Gly Pro Glu Glu
 370 375 380

Glu Glu Gly Glu Gly Tyr Glu Glu Pro Asp Ser Glu Glu Asp Ser Glu
385 390 395 400

Phe Tyr Glu Asn Asp Ser Asn Leu Gly Gln Asp Gln Leu Ser Gln Asp
405 410 415

Gly Ser Gly Tyr Glu Asn Pro Glu Asp Glu Pro Leu Gly Pro Glu Asp
420 425 430

Glu Asp Ser Phe Ser Asn Ala Glu Ser Tyr Glu Asn Glu Asp Glu Glu
435 440 445

Leu Thr Gln Pro Val Ala Arg Thr Met Asp Phe Leu Ser Pro His Gly
450 455 460

Ser Ala Trp Asp Pro Ser Arg Glu Ala Thr Ser Leu Ala Gly Ser Gln
465 470 475 480

Ser Tyr Glu Asp Met Arg Gly Ile Leu Tyr Ala Ala Pro Gln Leu Arg
485 490 495

Ser Ile Arg Gly Gln Pro Gly Pro Asn His Glu Glu Asp Ala Asp Ser
500 505 510

Tyr Glu Asn Met Asp Asn Pro Asp Gly Pro Asp Pro Ala Trp Gly Gly
515 520 525

Gly Gly Arg Met Gly Thr Trp Ser Thr Arg
530 535

<210> 35

<211> 31

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mẫu kháng thể phân tích MS

<220>

<221> MISC_đặc tính

<222> (8)..(8)

<223> X = S, P, A

<220>

<221> MISC_đặc tính

<222> (10)..(10)

<223> X = G hoặc A

<400> 35

Ser	Ser	Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Xaa	Asn	Xaa	Asn	Thr	Tyr	Leu	Asn	Trp
1				5					10					15	

Tyr	Leu	Gln	Lys	Pro	Gly	Gln	Ser	Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg
			20					25					30	

<210> 36

<211> 6

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 36

Asn	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr
1				5	

<210> 37

<211> 4

<212> PRT

<213> Mus musculus

<400> 37

Lys	Phe	Asn	Gly
1			

<210> 38

<211> 6

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh HVR-H2 được làm giống người bằng đột biến N64Q

<400> 38

Thr	Glu	Lys	Phe	Gln	Gly
1				5	

<210> 39

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh HVR-L2 được làm giống người bằng đột biến S27eP

<400> 39

Leu Glu Asn Pro Asn Gly Asn Thr

1

5

<210> 40

<211> 8

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh HVR-L2 được làm giống người bằng đột biến S27eP/N28S

<400> 40

Leu Glu Asn Pro Ser Gly Asn Thr

1

5

<210> 41

<211> 18

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Nhóm liên kết

<400> 41

Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly Gly Ser Gly Gly Gly

1

5

10

15

Gly Ser

<210> 42

<211> 15

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Mảnh thụ thể transferin ở người

<400> 42

Ile Gly Gln Asn Met Val Thr Ile Val Gln Ser Asn Gly Asn Leu

1

5

10

15

<210> 43
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mảnh thụ thể transferin ở người

<400> 43

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

<210> 44
 <211> 15
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Mảnh thụ thể transferin ở người

<400> 44

Gln	Ser	Asn	Gly	Asn	Leu	Asp	Pro	Val	Glu	Ser	Pro	Glu	Gly	Tyr
1				5					10					15

<210> 45
 <211> 32
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Nhóm liên kết peptit

<400> 45

Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly
1				5					10					15	

Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly
			20					25					30		

<210> 46
 <211> 118
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 46

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

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

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

Ala Met Ile Tyr Tyr Asp Ser Ser Lys Met Asn Tyr Ala Asp Thr Val
 50 55 60

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

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

Ala Val Pro Thr Ser His Tyr Val Val Asp Val Trp Gly Gln Gly Val
 100 105 110

Ser Val Thr Val Ser Ser
 115

<210> 47
 <211> 107
 <212> PRT
 <213> Mus musculus

<400> 47

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu
 1 5 10 15

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
 20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp
85 90 95

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

<210> 48

<211> 107

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Biến thể L104V và L106I của SEQ ID NO: 57

<400> 48

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ala Ser Leu Ser Ala Ser Leu Glu
1 5 10 15

Glu Ile Val Thr Ile Thr Cys Gln Ala Ser Gln Asp Ile Gly Asn Trp
20 25 30

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

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

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

Glu Asp Ile Gly Ile Tyr Tyr Cys Leu Gln Ala Tyr Asn Thr Pro Trp
85 90 95

Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105

<210> 49

<211> 122

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể được làm giống người 299-023 VH_DASG

<400> 49

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

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

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

Tyr Ile Trp Ser Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Ser
 50 55 60

Arg Val Thr Ile Ser Lys Thr Ser Thr Thr Val Ser Leu Lys Leu Ser
 65 70 75 80

Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg Arg Tyr
 85 90 95

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 50
 <211> 110
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Biến thể được làm giống người 299-009 VL_NYA

<400> 50

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 51
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 51

Gly Phe Ser Leu Ser Ser Tyr
 1 5

<210> 52
 <211> 5
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 52

Trp Ser Gly Gly Ser
 1 5

<210> 53
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Oryctolagus cuniculus

<400> 53

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Asn Gly Phe Asp
 1 5 10 15

Pro

<210> 54
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-000 HVR-H3 DASG

<400> 54

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp
 1 5 10 15

Pro

<210> 55
 <211> 17
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-000 HVR-H3 DAQG

<400> 55

Arg Tyr Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Gln Gly Phe Asp
 1 5 10 15

Pro

<210> 56
 <211> 11
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-000 HVR-L1 RAA

<400> 56

Arg Ala Ser Gln Ser Ile Ser Ser Tyr Leu Ala
 1 5 10

<210> 57
 <211> 7
 <212> PRT
 <213> *Oryctolagus cuniculus*

<400> 57

Arg Ala Ser Thr Leu Ala Ser
 1 5

<210> 58
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 299-000 HVR-L3 NYA

<400> 58

Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn Val Asp Asn Thr
 1 5 10

<210> 59
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 0

<400> 59

Gln Ser Leu Glu Asn Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

<210> 60
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 1

<400> 60

Gln Ser Leu Glu His Ser Asn Gly Asn Thr Tyr Leu
 1 5 10

<210> 61
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 2

<400> 61

Gln	Ser	Leu	Glu	Gln	Ser	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
1				5					10		

<210> 62
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 3

<400> 62

Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Ala	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
1				5					10		

<210> 63
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 4

<400> 63

Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Val	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
1				5					10		

<210> 64
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 5

<400> 64

Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Pro	Asn	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
1				5					10		

<210> 65
 <211> 12

<212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 6

<400> 65

Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Ser	Gln	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
1				5					10		

<210> 66
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 7

<400> 66

Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Ser	Asn	Ala	Asn	Thr	Tyr	Leu
1				5					10		

<210> 67
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 8

<400> 67

Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Ser	Asn	Val	Asn	Thr	Tyr	Leu
1				5					10		

<210> 68
 <211> 12
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự LC biến thể 9

<400> 68

Gln	Ser	Leu	Glu	Asn	Pro	Ser	Gly	Asn	Thr	Tyr	Leu
1				5					10		

<210> 69

<211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự HC biến thể 0

<400> 69

Thr	Glu	Lys	Phe	Asn	Gly	Lys	Ala	Thr	Leu
1				5					10

<210> 70
 <211> 10
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> Trình tự HC biến thể 1

<400> 70

Thr	Glu	Lys	Phe	Gln	Gly	Arg	Val	Thr	Met
1				5					10