(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) **1-0033020**

(51)[7] **C07K 16/28**; A61K 39/395

(13) **B**

(21) 1-2017-05305
(22) 16/06/2016
(86) PCT/US2016/037879 16/06/2016
(87) WO 2016/205520 22/12/2016
(30) 62/180,459 16/06/2015 US
(45) 25/08/2022 413
(43) 27/08/2018 365A
(73) GENENTECH, INC. (US)
1 DNA Way, South San Francisco, CA 94080-4990, United States of America
(72) HOTZEL, Isidro (US); JUNTTILA, Teemu, T. (FI); LI, Ji (US); SCHEER, Justin (US); DICARA, Danielle (GB); ELLERMAN, Diego (US); SPIESS, Christoph (DE); CARTER, Paul (US).
(74) Công ty TNHH Tầm nhìn và Liên danh (VISION & ASSOCIATES CO.LTD.)

(54) KHÁNG THỂ KHÁNG FCRH5, CHẾ PHẨM VÀ THỂ TIẾP HỢP MIỄN DỊCH CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, bao gồm kháng thể kháng FcRH5 chứa miền liên kết FcRH5 và miền liên kết CD3 (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép phụ thuộc vào tế bào T (TDB) FcRH5), và các sản phẩm như thể tiếp hợp miễn dịch và chế phẩm chứa chúng.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế này đề cập đến các kháng thể kháng FcRH5 và các phương pháp sử dụng kháng thể này.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Các rối loạn tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư, đặc trưng ở sự tăng trưởng không kiểm soát được của các tiểu quần thể tế bào. Chúng là nguyên nhân hàng đầu gây tử vong ở các nước phát triển và nguyên nhân xếp hạng hai gây tử vong ở các nước đang phát triển, với hơn 14 triệu ca ung thư mới được chẩn đoán và hơn tám triệu ca tử vong do ung thư diễn ra mỗi năm. Viện Ung thư Quốc Gia đã ước tính rằng sẽ có hơn nửa triệu người Mỹ chết vì ung thư vào năm 2016, chiếm gần một phần tư số ca tử vong tại nước này. Khi mà dân số cao tuổi tăng lên, thì tỷ lệ mắc phải bệnh ung thư cũng đồng thời tăng lên, vì khả năng phát triển bệnh ung thư sau tuổi bảy mươi cao hơn gấp hơn hai lần. Vì vậy, việc chăm sóc cho bệnh nhân ung thư đang là gánh nặng xã hội đáng kể và liên tục gia tăng.

Gen giống thụ thể Fc 5 (FcRH5, còn được gọi là FcRL5 hoặc IRTA2) thuộc về họ gồm sáu gen được nhận diện gần đây của siêu họ globulin miễn dịch (immunoglobulin superfamily-IgSF). Họ gồm các gen này có liên hệ gần với các thụ thể Fc có cấu trúc hệ gen được bảo toàn, chế phẩm miền Ig ngoại bào, và các motif truyền tín hiệu giống motif hoạt hóa trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch (immunoreceptor tyrosine-based activation motif-ITAM) và motif ức chế trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch (immunoreceptor tyrosine-based inhibitory motif-ITIM) (Davis et al. *Eur. J. Immunol.* 35:674-80, 2005). Sáu thành viên của họ thụ thể FcRH/IRTA đã được mô tả: FcRH1/IRTA5, FcRH2/IRTA4, FcRH3/IRTA3, FcRH4/IRTA1, FcRH5/IRTA2, và FcRH6 (Polson et al. *Int. Immunol.* 18(9):1363-1373, 2006. Các ADN bổ trợ của FcRH mã hóa glycoprotein xuyên màng loại I có nhiều miền ngoại bào giống Ig và miền bào chất chứa các motif truyền tín hiệu ức chế và/hoặc hoạt hóa trên cơ sở tyrosin thụ thể miễn dịch liên ứng. Các gen FcRH có

liên quan về mặt cấu trúc, và các sản phẩm protein của chúng có chung độ đồng nhất ngoại bào 28-60% với nhau. Chúng cũng có chung độ đồng nhất 15-31% với các họ hàng FcR gần nhất của chúng. Có mức độ tương đồng cao giữa các FcRH khác nhau.

(Các) phối tử của FcRH5 chưa được biết đến, nhưng FcRH5 có liên can đến sự biểu hiện isotyp thuận và sự tăng sinh tăng cường trong suốt quá trình phát triển của các tế bào B được mồi bằng kháng nguyên (Dement-Brown et al. *J. Leukoc. Biol.* 91:59-67, 2012). Locus FcRH5 có ba dạng đồng đẳng ARN thông tin chính (FcRH5a, FcRH5b, và FcRH5c). Các dạng đồng đẳng protein FcRH5 chính được mã hóa bằng các sản phẩm phiên mã này có chung một trình tự axit amin chung cho đến gốc 560, đề xuất một peptit tín hiệu chung và sáu miền giống Ig ngoại bào. FcRH5a thể hiện glycoprotein 759 axit amin được tiết có tám miền giống Ig, sau đó là 13 axit amin độc nhất, phân cực một cách nổi trội ở đầu tận cùng C của nó. FcRH5b rẽ ra từ FcRH5a ở gốc axit amin 560 và kéo dài trong một khoảng duỗi ngắn gồm 32 gốc nữa, có tính kỵ nước tương thích với phần tiếp nối của nó vào màng sinh chất thông qua neo móc GPI. FcRH5c là dạng đồng đẳng dài nhất có trình tự trệch khỏi FcRH5a ở axit amin 746. FcRH5c mã hóa glycoprotein xuyên màng 977 axit amin loại I có chín miền loại Ig ngoại bào chứa tám vị trí glycosyl hóa liên kết với N tiềm tàng, miền xuyên màng 23 axit amin, và miền bào chất 104 axit amin có ba motif liên kết SH2 liên ứng có dạng liên ứng ITIM.

Các gen FcRH được tạo cụm cùng nhau ở giữa các gen FcR cổ điển (FcγRI, FcγRII, FcγRIII, và FcεRI) trong vùng 1q21-23 của nhiễm sắc thể 1. Vùng này chứa một trong số các bất thường nhiễm sắc thể thứ phát hay gặp nhất gắn liền với kiểu hình ác tính ở các khối u tạo huyết, đặc biệt là ở bệnh đa u tủy (Hatzivassiliou et al. *Immunity.* 14:277-89, 2001). FcRH5 được biểu hiện chỉ ở dòng tế bào B, bắt đầu sớm như tiền tế bào B, nhưng không đạt được mức biểu hiện đầy đủ cho đến giai đoạn tế bào B trưởng thành. Không giống với hầu hết các protein bề mặt đặc hiệu với tế bào B đã biết khác (ví dụ, CD20, CD19, và CD22), FcRH5 tiếp tục được biểu hiện ở các tương bào, trong khi đó các dấu ấn đặc hiệu với tế bào B khác được điều hòa giảm (Polson et al. *Int. Immunol.* 18:1363-73, 2006). Ngoài ra, ARN thông tin của FcRH5 được biểu hiện quá mức ở các dòng tế bào đa u tủy có các bất thường 1q21 như được

phát hiện bằng các mảng oligonucleotit (Inoue *Am. J. Pathol.* 165:71-81, 2004). Mẫu hình biểu hiện này thể hiện rằng FcRH5 có thể là đích cho các liệu pháp trên cơ sở kháng thể dùng cho việc điều trị đa u tủy. Đa u tủy là dạng ác tính của các tương bào đặc trưng bởi các tổn thương khung xương, suy thận, thiếu máu, và tăng canxi-huyết, và bệnh này về cơ bản là không thể chữa khỏi bằng các liệu pháp hiện có. Các phương pháp điều trị dùng thuốc hiện có cho bệnh đa u tủy bao gồm tổ hợp của chất ức chế proteosom bortezomib (VELCADE®), chất điều biến miễn dịch lenalidomit (REVLIMID®), và steroit dexametason.

Liệu pháp trên cơ sở kháng thể đơn dòng (mAb) đã trở thành một mô thức điều trị quan trọng đối với bệnh ung thư. Các phương pháp phát hiện và các liệu pháp trên cơ sở kháng thể đặc hiệu với FcRH5c có thể là đặc biệt hiệu nghiệm khi mà chúng nhận biết một cách đặc hiệu tế bào đích, FcRH5 liên quan đến màng thay vì các kháng thể nhận biết cả dạng đồng đẳng màng và dạng đồng đẳng tan được của FcRH5. Tuy nhiên, chỉ có miền giống Ig sau cùng của FcRH5 (miền giống Ig 9) là vùng ngoại bào độc nhất biệt hóa giữa ba dạng đồng đẳng chính của FcRH5 (ví dụ, FcRH5a, FcRH5b, và FcRH5c), và có độ tương đồng đáng kể giữa các miền giống Ig trong FcRH5. Ngoài ra, miền giống Ig sau cùng được bảo toàn ở mức cao giữa FcRH1, FcRH2, FcRH3, và FcRH5. Liệu pháp trên cơ sở kháng thể bất kỳ mà được hướng đích đặc hiệu đến FcRH5 cần phải có tính phản ứng chéo tối thiểu với các FcRH khác để tránh các tác dụng ngoài đích có hại (ví dụ, FcRH3 được biểu hiện trên các tế bào NK bình thường).

Xét theo những điều trên đây, có nhu cầu chưa được đáp ứng trong lĩnh vực này về các chất an toàn và hữu hiệu để sử dụng để điều trị các rối loạn tăng sinh tế bào (ví dụ, các bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, đa u tủy).

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Sáng chế này đề xuất các kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép, ví dụ, các kháng thể đặc hiệu kép phụ thuộc vào tế bào T (TDB) FcRH5), các chế phẩm, và các phương pháp sử dụng kháng thể này để điều trị các rối loạn

tăng sinh tế bào (ví dụ, các bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, đa u tủy).

Theo khía cạnh thứ nhất, sáng chế đề xuất kháng thể giống chất kháng thụ thể Fc 5 (FcRH5), bao gồm miền liên kết bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 2, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 3, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 4, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 5, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 6.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104, (b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng (FR) sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm

miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 106, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 107, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 106. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 107. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 106 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 107.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15, và (f) HVR-

L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 56, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 21. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 84, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 85, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d)

FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 84. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 85. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 84 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 85.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 17, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 86, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 87, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 86. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 87. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit

amin là SEQ ID NO: 86 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 87.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 13, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 21. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 88, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 89, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 88. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 89. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 88 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 89.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-

L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 90, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 91, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 90. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 91. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 90 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 91.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 92, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 93, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây:(a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d)

FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 92. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 56, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 93. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 92 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 93.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 24. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 94, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 95, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 94. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 95. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit

amin là SEQ ID NO: 94 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 95.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 96, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 97, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 53, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 96. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 97. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 96 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 97.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18, và (f) HVR-

L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 98, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 99, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 55, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 98. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 99. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 98 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 99.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 25. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 101, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d)

FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 101. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 101.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 56, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit

amin là SEQ ID NO: 102 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 32, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 33, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 34, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 35, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 110, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 111, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 66, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 67, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 68, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 69. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 110. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 70, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 71, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 72, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 73. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 111. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 110 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 111.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 38, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 39, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 40, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 41, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID

NO: 42, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 43. Theo các phương án khác, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 112, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 113, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo các phương án khác, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 74, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 75, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 76, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 77. Theo các phương án khác, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 112. Theo các phương án khác, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 78, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 79, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 80, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 81. Theo các phương án khác, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 113. Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 112 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 113.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 26, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 27, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 28, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 29, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 30, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 31. Theo một số phương án, miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 108, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 109, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 58, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 59, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin

là SEQ ID NO: 60, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 61. Theo một số phương án, miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 108. Theo một số phương án, kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 62, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 63, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 64, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 65. Theo một số phương án, miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 109. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 108 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 109.

Theo một số phương án của một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào epitop trong miền giống Ig 9 của FcRH5. Theo một số phương án, epitop này bao gồm một phần của các axit amin 743-850 của SEQ ID NO: 114. Theo một số phương án, miền liên kết liên kết vào FcRH5 của người, FcRH5 của khỉ đuôi dài (cyno), hoặc cả hai. Theo một số phương án, miền liên kết không liên kết một cách đặc hiệu vào FcRH1, FcRH2, FcRH3, và/hoặc FcRH4. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của người với K_D bằng khoảng 100nM hoặc thấp hơn 100nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 10pM đến 100nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 100pM đến 100nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 1nM đến 20nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 1nM đến 10nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của cyno với K_D bằng khoảng 100nM hoặc thấp hơn 100nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của cyno với K_D nằm trong khoảng từ 10pM đến 100nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của cyno với K_D nằm trong khoảng từ 100pM đến 100nM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết FcRH5 của cyno với K_D nằm trong khoảng từ 1nM đến 50nM.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm đột biến vị trí không glycosyl hóa. Theo một số phương án, đột biến vị trí không glycosyl hóa này là đột biến dạng thay thế. Theo một số phương án, đột biến vị trí không glycosyl hóa này làm giảm chức năng tác động của kháng thể kháng FcRH5. Theo một số phương án, đột biến dạng thay thế này là ở gốc axit amin N297, L234, L235, D265, và/hoặc P329 (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, đột biến dạng thay thế này được chọn từ nhóm gồm N297G, N297A, L234A, L235A, D265A, và P329G. Theo một số phương án, đột biến dạng thay thế này là đột biến N297G.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 này là kháng thể IgG.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 này là mảnh kháng thể liên kết FcRH5. Theo một số phương án, mảnh kháng thể này được chọn từ nhóm gồm các mảnh bis-Fab, Fab, Fab'-SH, Fv, scFv, và $(Fab')_2$. Theo một số phương án, mảnh kháng thể này là mảnh bis-Fab.

Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 này là kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 này là kháng thể đơn đặc hiệu.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 này là kháng thể đa đặc hiệu. Theo một số phương án, kháng thể đa đặc hiệu này là kháng thể đặc hiệu kép. Theo một số phương án, kháng thể đặc hiệu kép bao gồm miền liên kết thứ hai mà liên kết cụm biệt hóa 3 (CD3). Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai liên kết vào epitop trên CD3 bao gồm gốc axit amin Glu6 của CD3. Theo một số phương án, epitop này còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin phụ thêm được chọn từ nhóm gồm Gln1, Asp2, và Met7 của CD3. Theo một số phương án, epitop này bao gồm các gốc axit amin Gln1, Asp2, và Glu6 của CD3. Theo một số phương án, epitop này bao gồm các gốc axit amin Gln1, Asp2, Glu6, và Met7 của CD3. Theo một số phương án, epitop này không bao gồm gốc axit amin Glu5 của CD3. Theo một số phương án, epitop này không bao gồm các gốc axit amin Gly3 và Glu5 của CD3. Theo một số phương án, epitop này gồm các gốc axit amin Gln1, Asp2, Glu6, và Met7 của CD3. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai có khả năng liên kết vào polypeptit

CD3 của người hoặc polypeptit CD3 của cyno. Theo một số phương án, polypeptit CD3 của người hoặc polypeptit CD3 của cyno lần lượt là polypeptit CD3ε của người hoặc polypeptit CD3ε của cyno. Theo một số phương án, polypeptit CD3 của người hoặc polypeptit CD3 của cyno lần lượt là polypeptit CD3γ của người hoặc polypeptit CD3γ của cyno. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai liên kết polypeptit CD3ε của người với K_D bằng khoảng 100nM hoặc thấp hơn 100nM. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai liên kết polypeptit CD3ε của người với K_D nằm trong khoảng từ 10pM đến 100nM. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai liên kết polypeptit CD3ε của người với K_D nằm trong khoảng từ 100pM đến 50nM. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai liên kết polypeptit CD3ε của người với K_D nằm trong khoảng từ 1nM đến 10nM.

Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 117, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 120. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 125, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 126, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 127, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 128. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là

SEQ ID NO: 133. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 129, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 130, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 131, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 132. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134.

Theo các phương án khác, miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 124. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 137, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 138, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 125, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 126, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 127, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 128. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 137. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 129, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 130, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 131, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 132. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 138. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 137 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 138.

Theo các phương án khác, miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 139, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 140, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 141, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 142, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 143, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 144. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 153, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 154, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 145, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 146, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 147, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 148. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 153. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 149, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 150, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 151, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 152. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 154. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 153 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 154.

Theo các phương án khác, miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 155, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 156, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 157, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 158, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 159, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 160.

Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 155, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 162, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 157, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 158, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 159, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 160. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 172, (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 173, hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b). Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nặng sau đây: (a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 164, (b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 165, (c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 166, và (d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 167. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 172. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây: (a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 168, (b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 169, (c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 170, và (d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 171. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 173. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 172 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 173.

Theo các phương án khác, miền liên kết mà liên kết FcRH5 bao gồm miền VH (VH_1) bao gồm vùng mang điện tích (CR_1) và miền VL (VL_1) bao gồm vùng mang điện tích (CR_2), trong đó CR_1 ở VH_1 tạo thành cặp điện tích với CR_2 ở VL_1. Theo một số phương án, CR_1 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_2 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Theo một số phương án, CR_1 bao gồm đột biến dạng thay thế Q39K (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_1 gồm đột biến dạng thay thế Q39K. Theo một số phương án, CR_2 bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_2 gồm đột biến dạng thay thế Q38E.

Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai mà liên kết CD3 bao gồm miền VH (VH_2) gồm vùng mang điện tích (CR_3) và miền VL (VL_2) gồm vùng mang điện tích (CR_4), trong đó CR_4 *ở* VL_2 tạo thành cặp điện tích với CR_3 ở VH_2. Theo một số phương án, CR_4 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_3 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Theo một số phương án, CR_4 bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_4 gồm đột biến dạng thay thế Q38K. Theo một số phương án, CR_3 bao gồm đột biến dạng thay thế Q39E (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_3 gồm đột biến dạng thay thế Q39E. Theo một số phương án, miền VL_1 được liên kết vào miền hằng định (CL) của chuỗi nhẹ (CL_1) và VH_1 được liên kết vào miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng ($CH1_1$), trong đó CL_1 bao gồm vùng mang điện tích (CR_5) và $CH1_1$ bao gồm vùng mang điện tích (CR_6), và trong đó CR_5 ở CL_1 tạo thành cặp điện tích với CR_6 ở $CH1_1$. Theo một số phương án, CR_5 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_6 bao gồm gốc có tính axit. Theo một số phương án, CR_5 bao gồm đột biến dạng thay thế V133K (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_5 gồm đột biến dạng thay thế V133K. Theo một số phương án, CR_6 bao gồm đột biến dạng thay thế S183E (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_6 gồm đột biến dạng thay thế S183E.

Theo các phương án khác, miền VL_2 được liên kết vào miền CL (CL_2) và VH_2 được liên kết vào miền CH1 ($CH1_2$), trong đó CL_2 bao gồm vùng mang điện tích (CR_7) và $CH1_2$ bao gồm vùng mang điện tích (CR_8), và trong đó CR_8 ở $CH1_2$ tạo thành cặp điện tích với CR_7 ở CL_2. Theo một số phương án, CR_8 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_7 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Theo một số phương án, CR_8 bao gồm đột biến dạng thay thế S183K (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_8 gồm đột biến dạng thay thế S183K. Theo một số phương án, CR_7 bao gồm đột biến dạng thay thế V133E (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_7 gồm đột biến dạng thay thế V133E.

Theo các phương án khác, miền VL_2 được liên kết vào miền CL (CL_2) và VH_2 được liên kết vào miền CH1 ($CH1_2$), trong đó (a) CL_2 bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở các gốc axit amin F116, L135, S174, S176, và/hoặc T178 (cách đánh số Châu Âu) và (b) $CH1_2$ bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở các gốc axit amin A141, F170, S181, S183, và/hoặc V185 (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CL_2

bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến dạng thay thế sau đây: F116A, L135V, S174A, S176F, và/hoặc T178V. Theo một số phương án, CL_2 bao gồm các đột biến dạng thay thế sau đây: F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V. Theo một số phương án, $CH1_2$ bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến dạng thay thế sau đây: A141I, F170S, S181M, S183A, và/hoặc V185A. Theo một số phương án, $CH1_2$ bao gồm các đột biến dạng thay thế sau đây: A141I, F170S, S181M, S183A, và V185A.

Theo các phương án khác, miền liên kết mà liên kết FcRH5 bao gồm miền VH (VH_1) bao gồm vùng mang điện tích (CR_1) và miền VL (VL_1) bao gồm vùng mang điện tích (CR_2), trong đó CR_2 ở VL_1 tạo thành cặp điện tích với CR_1 ở VH_1. Theo một số phương án, CR_2 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_1 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Theo một số phương án, CR_2 bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_2 gồm đột biến dạng thay thế Q38K. Theo một số phương án, CR_1 bao gồm đột biến dạng thay thế Q39E (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_1 gồm đột biến dạng thay thế Q39E. Theo một số phương án, miền liên kết thứ hai mà liên kết CD3 bao gồm miền VH (VH_2) bao gồm vùng mang điện tích (CR_3) và miền VL (VL_2) bao gồm vùng mang điện tích (CR_4), trong đó CR_3 ở VH_2 tạo thành cặp điện tích với CR_4 ở VL_2. Theo một số phương án, CR_3 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_4 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Theo một số phương án, CR_3 bao gồm đột biến dạng thay thế Q39K (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_3 gồm đột biến dạng thay thế Q39K. Theo một số phương án, CR_4 bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_4 gồm đột biến dạng thay thế Q38E. Theo một số phương án, miền VL_1 được liên kết vào miền hằng định (CL) của chuỗi nhẹ (CL_1) và VH_1 được liên kết vào miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng ($CH1_1$), trong đó CL_1 bao gồm vùng mang điện tích (CR_5) và $CH1_1$ bao gồm vùng mang điện tích (CR_6), và trong đó CR_6 ở $CH1_1$ tạo thành cặp điện tích với CR_5 ở CL_1. Theo một số phương án, CR_6 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_5 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Theo một số phương án, CR_6 bao gồm đột biến dạng thay thế S183K (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_6 gồm đột biến dạng thay thế S183K. Theo một số phương án, CR_5 bao gồm đột biến dạng thay thế V133E

(cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_5 gồm đột biến dạng thay thế V133E.

Theo các phương án khác, miền VL_2 được liên kết vào miền CL (CL_2) và VH_2 được liên kết vào miền CH1 ($CH1_2$), trong đó CL_2 bao gồm vùng mang điện tích (CR_7) và $CH1_2$ bao gồm vùng mang điện tích (CR_8), và trong đó CR_7 ở CL_2 tạo thành cặp mang điện tích với CR_8 ở $CH1_2$. Theo một số phương án, CR_7 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_8 bao gồm gốc có tính axit. Theo một số phương án, CR_7 bao gồm đột biến dạng thay thế V133K (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_7 gồm đột biến dạng thay thế V133K. Theo một số phương án, CR_8 bao gồm đột biến dạng thay thế S183E (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CR_8 gồm đột biến dạng thay thế S183E.

Theo các phương án khác, miền VL_2 được liên kết vào miền CL (CL_2) và VH_2 được liên kết vào miền CH1 ($CH1_2$), trong đó (a) CL_2 bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở các gốc axit amin F116, L135, S174, S176, và/hoặc T178 (cách đánh số Châu Âu) và (b) $CH1_2$ bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở các gốc axit amin A141, F170, S181, S183, và/hoặc V185 (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, CL_2 bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến dạng thay thế sau đây: F116A, L135V, S174A, S176F, và/hoặc T178V. Theo một số phương án, CL_2 bao gồm các đột biến dạng thay thế sau đây: F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V. Theo một số phương án, $CH1_2$ bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến dạng thay thế sau đây: A141I, F170S, S181M, S183A, và/hoặc V185A. Theo một số phương án, $CH1_2$ bao gồm các đột biến dạng thay thế sau đây: A141I, F170S, S181M, S183A, và V185A. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm một hoặc nhiều miền hằng định chuỗi nặng, trong đó một hoặc nhiều miền hằng định chuỗi nặng được chọn từ trong số miền CH2 thứ nhất ($CH2_1$), miền CH3 thứ nhất ($CH3_1$), miền CH2 thứ hai ($CH2_2$), và miền CH3 thứ hai ($CH3_2$). Theo một số phương án, ít nhất một miền trong số một hoặc nhiều miền hằng định chuỗi nặng được ghép cặp với một miền hằng định chuỗi nặng khác. Theo một số phương án, mỗi $CH3_1$ và $CH3_2$ bao gồm phần lồi (P_1) hoặc khoang (C_1), và trong đó P_1 hoặc C_1 ở $CH3_1$ lần lượt có thể đặt được vào C_1 hoặc P_1, ở $CH3_2$. Theo một số phương án, $CH3_1$ và $CH3_2$ giao nhau ở mặt phân cách giữa P_1 và C_1. Theo một số phương án, mỗi $CH2_1$ và $CH2_2$

bao gồm (P_2) hoặc khoang (C_2), và trong đó P_2 hoặc C_2 ở $CH2_1$ lần lượt có thể đặt được vào C_2 hoặc P_2, ở $CH2_2$. Theo một số phương án, $CH2_1$ và $CH2_2$ giao nhau ở mặt phân cách giữa P_2 và C_2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23, và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123, và trong đó mỗi nhánh kháng FcRH5 và nhánh kháng CD3 bao gồm đột biến dạng thay thế N297G (cách đánh số Châu Âu), và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm đột biến dạng thay thế T366W và nhánh kháng CD3 bao gồm các đột biến dạng thay thế T366S, L368A, và Y407V.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23, và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119, và (f) HVR-L3 bao gồm

trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123, và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G, và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G, và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23, và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123, và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm

chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G, và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G, và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23, và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123, và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và

chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G, và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38K, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G, và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38K, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23, và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115, (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116, (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121, (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118, (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119, và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123, và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và

chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G, và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38E, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G, và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38E, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một số phương án của một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh của sáng chế, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 10ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 10ml/kg/ngày đến 20ml/kg/ngày ở chuột nhắt. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 12ml/kg/ngày đến 16ml/kg/ngày ở chuột nhắt. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 20ml/kg/ngày đến 40ml/kg/ngày ở khỉ cyno. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 25ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày ở khỉ cyno. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 30ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày ở khỉ cyno.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, hoặc một phần của nó bao gồm miền liên kết của nó mà liên kết vào FcRH5.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất vật truyền bao gồm axit nucleic đã được phân lập theo khía cạnh trên đây.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất tế bào chủ bao gồm vật truyền theo khía cạnh trên đây. Theo một số phương án, tế bào chủ này là tế bào động vật có vú. Theo một số phương án, tế bào động vật có vú này là tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO). Theo một số phương án, tế bào chủ này là tế bào nhân sơ. Theo một số phương án, tế bào nhân sơ này là tế bào *E. coli*.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp sản xuất kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây của sáng chế, phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ theo khía cạnh trên đây trong môi trường nuôi cấy. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi kháng thể kháng FcRH5 từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai mã hóa kháng thể kháng CD3 mà bao gồm miền liên kết liên kết với CD3. Theo một số phương án, các tế bào chủ được nuôi cấy đồng thời. Theo một số phương án, phương pháp này còn bao gồm bước thu hồi kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép từ các tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây và chất gây độc tế bào.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất chế phẩm bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh của sáng chế. Theo một số phương án, chế phẩm này còn bao gồm chất pha loãng hoặc tá dược dược dụng. Theo một số phương án, tá dược dược dụng này là dung dịch đệm, chất mang, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản. Theo một số phương án, chế phẩm này là dược phẩm. Theo một số phương án, chế phẩm này còn bao gồm chất đối kháng liên kết trục PD-1 hoặc chất trị liệu phụ thêm.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây của sáng chế để sử dụng làm thuốc.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây của sáng chế để sử dụng để điều trị hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư dương tính với FcRH5 ở đối tượng cần đến phương pháp điều trị này.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây của sáng chế để sử dụng để tăng cường chức năng miễn dịch ở đối tượng có bệnh ung thư dương tính với FcRH5. Theo một số phương án, bệnh ung thư dương tính với FcRH5 này là ung thư tế bào B. Theo một khía cạnh khác, bệnh ung thư tế bào B này được chọn từ nhóm gồm đa u tủy (MM), bệnh bạch cầu dạng bạch huyết mạn tính (CLL), u bạch huyết tế bào áo nang (MCL), u bạch huyết tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), và u bạch huyết thể nang (FL). Theo một phương án khác, bệnh ung thư tế bào B này là MM.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cách sử dụng kháng thể kháng FcRH5 hoặc chế phẩm theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây trong sản xuất thuốc dùng để điều trị hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư dương tính với FcRH5 ở đối tượng. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất cách sử dụng kháng thể kháng FcRH5 hoặc chế phẩm theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây trong sản xuất thuốc dùng để tăng cường chức năng miễn dịch ở đối tượng có bệnh ung thư dương tính với FcRH5. Theo một số phương án, bệnh ung thư dương tính với FcRH5 này là bệnh ung thư tế bào B. Theo một số phương án, bệnh ung thư tế bào B này được chọn từ nhóm gồm MM, CLL, MCL, DLBCL, và FL. Theo một số phương án, bệnh ung thư tế bào B này là MM.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp điều trị hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư dương tính với FcRH5 ở đối tượng cần đến phương pháp điều trị này, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng này dùng kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây của sáng chế. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp tăng cường chức năng miễn dịch ở đối tượng có bệnh ung thư dương tính với FcRH5, phương pháp này bao

gồm việc cho đối tượng này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây của sáng chế. Theo một số phương án, bệnh ung thư dương tính với FcRH5 này là bệnh ung thư tế bào B. Theo một số phương án, bệnh ung thư tế bào B này được chọn từ nhóm gồm MM, CLL, MCL, DLBCL, và FL. Theo một số phương án, bệnh ung thư tế bào B này là MM. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào (a) phân tử FcRH5 nằm trên tế bào đích và (b) phân tử CD3 nằm trên tế bào tác động miễn dịch. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 hoạt hóa tế bào tác động miễn dịch sau khi liên kết vào phân tử FcRH5 và phân tử CD3. Theo một số phương án, tế bào tác động miễn dịch đã được hoạt hóa có khả năng tạo ra tác dụng gây độc tế bào và/hoặc tác dụng chết tế bào theo chương trình đối với tế bào đích. Theo một số phương án, tế bào đích này là tương bào. Theo một số phương án, tương bào này là tương bào có thời gian sống ngắn. Theo một số phương án, tương bào này là tương bào có thời gian sống dài. Theo một số phương án, tương bào này là tế bào u tủy. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng kháng thể kháng FcRH5 ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg/tuần đến 50mg/kg/tuần. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng kháng thể kháng FcRH5 ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg/tuần đến 10mg/kg/tuần. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho đối tượng dùng kháng thể kháng FcRH5 ở liều lượng là khoảng 1mg/kg/tuần.

Theo các phương án khác, phương pháp này còn bao gồm việc cho đối tượng này dùng chất đối kháng liên kết trục PD-1 và/hoặc chất trị liệu phụ thêm. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục PD-1 hoặc chất trị liệu phụ thêm được cho dùng trước hoặc sau khi dùng kháng thể kháng FcRH5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục PD-1 hoặc chất trị liệu phụ thêm được cho dùng đồng thời với kháng thể kháng FcRH5. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục PD-1 được chọn từ nhóm gồm chất đối kháng liên kết PD-L1, chất đối kháng liên kết PD-1, và chất đối kháng liên kết PD-L2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục PD-1 là chất đối kháng liên kết PD-L1. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-L1 được chọn từ nhóm gồm MPDL3280A (atezolizumab), YW243.55.S70, MDX-1105, MEDI4736 (durvalumab), và MSB0010718C

(avelumab). Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-L1 là MPDL3280A (atezolizumab). Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục PD-1 là chất đối kháng liên kết PD-1. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-1 được chọn từ nhóm gồm MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), CT-011 (pidilizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810, và BGB-108. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết trục PD-1 là chất đối kháng liên kết PD-L2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-L2 là kháng thể hoặc chất kết dính miễn dịch. Theo một số phương án, đối tượng dùng steroit, chất điều biến miễn dịch (IMiD), chất ức chế proteosom (PI), hoặc dạng kết hợp của chúng. Theo một số phương án, steroit là glucocorticoit. Theo một số phương án, glucocorticoit là dexametason. Theo một số phương án, IMiD là lenalidomit. Theo một số phương án, PI là bortezomib.

Theo các phương án khác, phương pháp này bao gồm việc cho dùng kháng thể kháng FcRH5, chất đối kháng liên kết trục PD-1, steroit, IMiD, PI, hoặc dạng kết hợp của chúng, theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, khu trú, qua đường miệng, qua da, trong màng bụng, trong hốc mắt, bằng cách cấy ghép, bằng phương pháp xông hít, trong khoang dịch não tủy, trong não thất, hoặc trong mũi. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho dùng kháng thể kháng FcRH5, chất đối kháng liên kết trục PD-1, steroit, IMiD, PI, hoặc dạng kết hợp của chúng, trong tĩnh mạch. Theo một số phương án, phương pháp này bao gồm việc cho dùng kháng thể kháng FcRH5, chất đối kháng liên kết trục PD-1, steroit, IMiD, PI, hoặc dạng kết hợp của chúng, dưới da. Theo một số phương án của một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, đối tượng này là con người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất phương pháp dùng để phát hiện FcRH5 trong mẫu sinh phẩm từ đối tượng, trong đó phương pháp này bao gồm các bước: (a) cho mẫu sinh phẩm này tiếp xúc với kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh của sáng chế trong các điều kiện cho phép kháng thể kháng FcRH5 này liên kết vào FcRH5 có trong tự nhiên trong mẫu sinh phẩm này, và (b) phát hiện xem liệu phức hợp có được tạo ra giữa kháng thể kháng FcRH5

và FcRH5 có trong tự nhiên trong mẫu sinh phẩm đó hay không. Theo một số phương án, mẫu sinh phẩm này là mẫu máu. Theo một số phương án của khía cạnh này, đối tượng này là con người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây của sáng chế và tờ hướng dẫn sử dụng bao gồm các hướng dẫn về việc sử dụng kháng thể kháng FcRH5 để điều trị hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư dương tính với FcRH5 ở đối tượng. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề xuất bộ kit bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây của sáng chế và tờ hướng dẫn sử dụng bao gồm các hướng dẫn về việc sử dụng kháng thể kháng FcRH5 để tăng cường chức năng miễn dịch ở đối tượng có bệnh ung thư dương tính với FcRH5. Theo một số phương án của các khía cạnh này, đối tượng này là con người.

Mô tả vắn tắt các hình vẽ

Fig.1A là giản đồ thể hiện dạng kết cấu theo Rational Design làm ví dụ (Dạng kết cấu 1) của FcRH5 TDB có các miền VL, VH, CL, và CH1 bao gồm một hoặc nhiều vùng mang điện tích. Đối với Dạng kết cấu 1 này, các miền VH_1, CL_1, VL_2, và $CH1_2$ chứa các vùng mang điện tích có tính bazơ, và các miền VL_1, $CH1_1$, VH_2, và CL_2 chứa các vùng mang điện tích có tính axit.

Fig.1B là giản đồ thể hiện dạng kết cấu theo Rational Design làm ví dụ (Dạng kết cấu 2) của FcRH5 TDB có các miền VL, VH, CL, và CH1 bao gồm một hoặc nhiều vùng mang điện tích. Đối với Dạng kết cấu 2 này, các miền VH_1, CL_1, VL_2, và $CH1_2$ chứa các vùng mang điện tích có tính axit, và các miền VL_1, $CH1_1$, VH_2, và CL_2 chứa các vùng mang điện tích có tính bazơ.

Fig.1C là giản đồ thể hiện dạng kết cấu theo Rosetta Design làm ví dụ (Dạng kết cấu 1) của FcRH5 TDB có các miền VL, VH, CL, và CH1 bao gồm một hoặc nhiều vùng mang điện tích. Đối với Dạng kết cấu 1 này, các miền VH_1, CL_1, và VL_2 chứa các vùng mang điện tích có tính bazơ, và các miền VL_1, $CH1_1$, và VH_2 chứa các vùng mang điện tích có tính axit. Ngoài ra, miền $CH1_2$ chứa khoang, và miền CL_2 chứa phần lồi. Khoang và phần lồi được thể hiện dưới dạng khung màu đen ở mặt phân cách $CH1_2/CL_2$.

Fig.1D là giản đồ thể hiện một dạng kết cấu theo Rosetta Design làm ví dụ (Dạng kết cấu 2) của FcRH5 TDB có các miền VL, VH, CL, và CH1 bao gồm một hoặc nhiều vùng mang điện tích. Đối với Dạng kết cấu 2 này, các miền VH_1, CL_1, và VL_2 chứa các vùng mang điện tích có tính axit, và các miền VL_1, $CH1_1$, và VH_2 chứa các vùng mang điện tích có tính bazơ. Ngoài ra, miền $CH1_2$ chứa khoang, và miền CL_2 chứa phần lồi. Khoang và phần lồi được thể hiện dưới dạng khung màu đen ở mặt phân cách $CH1_2/CL_2$.

Fig.1E là giản đồ thể hiện dạng kết cấu theo Rosetta Design thay thế làm ví dụ (Dạng kết cấu thay thế 1) của FcRH5 TDB có các miền VL, VH, CL, và CH1 bao gồm một hoặc nhiều vùng mang điện tích. Đối với Dạng kết cấu thay thế 1 này, các miền VL_1, VH_2, và CL_2 chứa các vùng mang điện tích có tính axit, và các miền VH_1, $CH1_2$, và VL_2 chứa các vùng mang điện tích có tính bazơ. Ngoài ra, miền $CH1_1$ chứa khoang, và miền CL_1 chứa phần lồi. Khoang và phần lồi được thể hiện dưới dạng khung màu đen ở mặt phân cách $CH1_1/CL_1$.

Fig.1F là giản đồ thể hiện dạng kết cấu theo Rosetta Design thay thế làm ví dụ (Dạng kết cấu thay thế 2) của FcRH5 TDB có các miền VL, VH, CL, và CH1 bao gồm một hoặc nhiều vùng mang điện tích. Đối với Dạng kết cấu thay thế 2 này, các miền VL_1, VH_2, và CL_2 chứa các vùng mang điện tích có tính bazơ, và các miền VH_1, $CH1_2$, và VL_2 chứa các vùng mang điện tích có tính axit. Ngoài ra, miền $CH1_1$ chứa khoang, và miền CL_1 chứa phần lồi. Khoang và phần lồi được thể hiện dưới dạng khung màu đen ở mặt phân cách $CH1_1/CL_1$.

Fig.2 là một dạng xếp thẳng hàng của các trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của các kháng thể kháng FcRH5 chọn lọc. Các thay đổi so với 1G7 (xem Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2015-0098900, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn) được thể hiện trong các khung màu sẫm. Các vùng siêu biến (HVR) được thể hiện bằng các đường bên trên và/hoặc bên dưới các dạng xếp thẳng hàng. Các trình tự miền VL này cũng được bộc lộ ở dạng các SEQ ID NO: 83, 85, 87, 89, 91, 93, 95, 97, 99, và 101.

Fig.3 là một dạng xếp thẳng hàng của các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của các kháng thể kháng FcRH5 chọn lọc. Các thay đổi so với dòng vô tính

1G7 (xem Công bố đơn sáng chế Mỹ số. 2015-0098900) được thể hiện trong các khung màu sẫm. Các vùng siêu biến (HVR) được thể hiện bằng các đường bên trên và/hoặc bên dưới các dạng xếp thẳng hàng. Các trình tự miền VH này cũng được bộc lộ ở dạng các SEQ ID NO: 82, 84, 86, 88, 90, 92, 94, 96, 98, và 100.

Fig.4 là bảng thể hiện tác động đến ái lực liên kết của các cải biến dạng thay thế axit amin ở vị trí 52 của các kháng thể kháng FcRH5 được thể hiện.

Fig.5A là một dạng xếp thẳng hàng của các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của hu1G7.v85 và hu1G7.v93. Các thay đổi so với trình tự dòng mầm của người hIGHV4-59*01 được thể hiện trong các khung có bóng mờ. Các vùng siêu biến (HVR) được thể hiện bằng các nhãn bên trên các dạng xếp thẳng hàng. Các trình tự miền VH này cũng được bộc lộ ở dạng các SEQ ID NO: 104 (hu1G7.v85) và 106 (hu1G7.v93).

Fig.5B là một dạng xếp thẳng hàng của các trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của hu1G7.v85 và hu1G7.v93. Các thay đổi so với trình tự dòng mầm của người hIGKV1-16*01 được thể hiện trong các khung có bóng mờ. Các vùng siêu biến (HVR) được thể hiện bằng các nhãn bên trên các dạng xếp thẳng hàng. Các trình tự miền VL này cũng được bộc lộ ở dạng các SEQ ID NO: 105 (hu1G7.v85) và 107 (hu1G7.v93).

Fig.6A là một dạng xếp thẳng hàng của các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của hu1G7.v85. 1G7, và H4 liên ứng. Các thay đổi so với dòng vô tính 1G7 đã được biến đổi giống như của người, làm trưởng thành ái lực, và hoàn thiện (xem Công bố đơn sáng chế Mỹ số. 2015-0098900, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn) được thể hiện trong các khung có bóng mờ. Các vùng siêu biến (HVR) được thể hiện bằng các nhãn bên trên các dạng xếp thẳng hàng. Trình tự miền VH của hu1G7.v85 được bộc lộ ở dạng SEQ ID NO: 104.

Fig.6B là một dạng xếp thẳng hàng của các trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của hu1G7.v85, 1G7, và KI liên ứng. Các thay đổi so với dòng vô tính 1G7 được biến đổi giống như của người, làm trưởng thành ái lực, và hoàn thiện được thể hiện trong các khung có bóng mờ. Trình tự miền VL của hu1G7.v85 được bộc lộ ở dạng SEQ ID NO: 105.

Fig.7A thể hiện trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể kháng FcRH5 hu1G7.v93 (SEQ ID NO: 106).

Fig.7B thể hiện trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể kháng FcRH5 hu1G7.v93 (SEQ ID NO: 107).

Fig.8 là biểu đồ thể hiện độ chuẩn kháng thể của các kháng thể 1G7.v85 và 1G7.v87.

Fig.9A là biểu đồ chập so sánh khả năng liên kết của các FcRH5/38E4.v1 TDB có các nhánh kháng FcRH5 khác nhau (tức là, m1G7 ("1G7 TDB"), 1G7.v85 ("1G7.v85 TDB"), và 1G7.v1.4 ("1G7.v1.4 TDB")) vào các tế bào biểu hiện quá mức FcRH3.

Fig.9B là biểu đồ thể hiện rằng 1G7.v85 TDB không làm tiêu tan các tế bào tiêu diệt tự nhiên (Natural Killer-NK) ở các nồng độ ≤ 20μg/ml;1G7.v85 TDB có EC50 trung vị là 25ng/ml trên các tương bào (PC).

Fig.10A là một loạt các biểu đồ so sánh khả năng của FcRH5 TDB 1G7.v1.4/38E4.v1 ("1G7.v1.4 TDB") trong việc liên kết FcRH3, FcRH5 của người, và FcRH5 của cyno.

Fig.10B là một loạt các biểu đồ so sánh khả năng của 1G7.v85 TDB trong việc liên kết FcRH3, FcRH5 của người, và FcRH5 của cyno.

Fig.10C là một loạt các biểu đồ so sánh khả năng của FcRH5 TDB 1G7/38E4.v1 ("1G7 TDB") trong việc liên kết FcRH3, FcRH5 của người, và FcRH5 của cyno.

Fig.10D là một loạt các biểu đồ so sánh khả năng của kháng thể đối chứng trong việc liên kết FcRH3, FcRH5 của người, và FcRH5 của cyno.

Fig.11A thể hiện trình tự của trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể kháng FcRH5 có nguồn gốc từ thỏ, đã được biến đổi giống như của người hu7D8.L1H2. Trình tự miền VH của hu7D8.L1H2 được bộc lộ ở dạng SEQ ID NO: 108.

Fig.11B thể hiện trình tự của trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể kháng FcRH5 có nguồn gốc từ thỏ, đã được biến đổi giống như của người hu7D8.L1H2. Trình tự miền VL của hu7D8.L1H2 được bộc lộ ở dạng SEQ ID NO: 109.

Fig.12A thể hiện trình tự của các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể kháng FcRH5 có nguồn gốc từ chuột 17B1. Các trình tự miền VH của 17B1 được bộc lộ ở dạng SEQ ID NO: 110.

Fig.12B thể hiện trình tự của trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể kháng FcRH5 có nguồn gốc từ chuột 17B1. Các trình tự miền VL của 17B1 được bộc lộ ở dạng SEQ ID NO: 111.

Fig.13A thể hiện trình tự của các trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) của kháng thể kháng FcRH5 có nguồn gốc từ chuột 15G8. Trình tự miền VH của 15G8 được bộc lộ ở dạng SEQ ID NO: 112.

Fig.13B thể hiện trình tự của trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) của kháng thể kháng FcRH5 có nguồn gốc từ chuột 15G8. Trình tự miền VL của 15G8 được bộc lộ ở dạng SEQ ID NO: 113.

Fig.14 là một loạt các biểu đồ thể hiện ái lực liên kết của biến thể được biến đổi giống như của người của các kháng thể kháng FcRH5 có nguồn gốc từ thỏ 7D8.Rb và h7D8.L1H2 vào FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno.

Fig.15 là một loạt các biểu đồ thể hiện rằng FcRH5 TDB 1G7.v85 TDB và hu1G7.v93/38E4.v1 ("1G7.v93 TDB") liên kết với cả FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno với ái lực tương đương nhau.

Các hình vẽ Fig.16A-Fig.16B là các biểu đồ thể hiện phép phân tích động học về khả năng liên kết 1G7.v85 TDB vào FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno lần lượt với các hằng số phân ly (K_D) là 2,35nM và 6,76nM, như được đo bằng BIACORE® trong dạng thức bắt hIgG bằng cách sử dụng mô hình liên kết 1:1 có ái lực hóa trị một.

Các hình vẽ Fig.17A-Fig.17B là các biểu đồ thể hiện sự gia tăng độc tính tế bào do FcRH5 kích thích của các tế bào MOLP-2 (tức là, các tế bào đa u tủy của người mà

biểu hiện FcRH5 theo kiểu nội sinh) bằng cách sử dụng các biến thể đã được làm trưởng thành ái lực và biến đổi giống như của người của 1G7 đã được định dạng thành các kháng thể đặc hiệu kép phụ thuộc vào tế bào T (TDB) có nhánh liên kết CD3 của 38E4.v1 (xem Công bố đơn PCT số WO 2015-095392 A1, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Ở Fig.17A, 1G7 TDB, hu1G7.v1.1/38E4.v1 ("1G7.v1.1 TDB"), hu1G7.v1.2/38E4.v1 ("1G7.v1.2 TDB"), hu1G7.v1.3/38E4.v1 ("1G7.v1.3 TDB"), và 1G7.v1.4 TDB được đánh giá. Ở Fig.17B, 1G7.v1.4 TDB, hu1G7.v1.5/38E4.v1 ("1G7.v1.5" TDB), hu1G7.v1.13/38E4.v1 ("1G7.v1.13 TDB"), hu1G7.v1.7/38E4.v1 ("1G7.v1.7 TDB"), và hu1G7.v1.13.1/38E4.v1 ("1G7.v1.13.1") được đánh giá. 1G7.v.1.4 TDB đã cải thiện khả năng tiêu diệt tế bào đích (EC50) gấp từ 5 lần đến 13 lần so với 1G7 TDB của chuột (n=10).

Các hình vẽ Fig.18A-Fig.18D là các biểu đồ so sánh khả năng của 1G7.v1.4 TDB và 1G7.v85 TDB trong việc hoạt hóa các tế bào T (Fig.18A), tiêu diệt các tế bào đích MOLP-2 (Fig.18B), tiêu diệt các tương bào đích ở khỉ cyno (Fig.18C), và tiêu diệt các tế bào B đích ở khỉ cyno (Fig.18D).

Fig.19A là một loạt các biểu đồ tần suất so sánh khả năng của 1G7.v85 TDB và hu1G7.v87/38E4.v1 TDB ("1G7.v87 TDB") trong việc liên kết và phản ứng chéo với các tế bào SVT2 của chuột nhắt biểu hiện FcRH5 của người (Ô 1), FcRH5 của khỉ cyno (Ô 2), và FcRH3 của người (Ô 3).

Các hình vẽ Fig.19B-Fig.19D là các biểu đồ so sánh khả năng của 1G7.v85 TDB và 1G7.v87 TDB trong việc tiêu diệt các tế bào đích MOLP-2 (Fig.19B), các tế bào B của người (Fig.19C), và các tế bào B của khỉ cyno (Fig.19D).

Các hình vẽ Fig.20A-Fig.20D là các biểu đồ thể hiện khả năng giảm của 1G7.v85 TDB trong việc liên kết FcRH5 sau khi trải qua xét nghiệm ứng suất 2,2'-azobis(2-amidopropan)dihydroclorua (AAPH) (Fig.20B) hoặc xét nghiệm ứng suất ánh sáng (Fig.20D), khi so với các đối chứng không được tạo ứng suất tương ứng (Fig.20A và Fig.20C).

Fig.21A là biểu đồ thể hiện phép phân tích về sự phân bố theo kích cỡ của 1G7.v85 TDB. 1G7.v85 TDB đã mất 0,1% đỉnh monome sau hai tuần ứng suất trong dung dịch his-axetat ở độ pH = 5,5.

Fig.21B là biểu đồ thể hiện tính không thuần nhất điện tích của 1G7.v85 TDB. 1G7.v85 TDB đã mất 7,7% đỉnh monome sau hai tuần ứng suất trong dung dịch his-axetat ở độ pH = 5,5

Fig.22A là biểu đồ thể hiện rằng 1G7.v85 TDB không có sự thay đổi có thể quan sát được nào về biên dạng khối lượng giảm của khối lượng chuỗi nhẹ sau hai tuần ứng suất trong dung dịch his-axetat ở độ pH = 5,5.

Fig.22B là biểu đồ thể hiện rằng 1G7.v85 TDB không có sự thay đổi có thể quan sát được nào về biên dạng khối lượng giảm của khối lượng chuỗi nặng sau hai tuần ứng suất trong dung dịch his-axetat ở độ pH = 5,5.

Fig.23A là phương pháp thấm tách phương Tây phospho-SLP76 đối với các tế bào CD8 ngoại vi từ đối tượng cho khỏe mạnh đã được kích thích bằng 1µg/ml của 1G7/UCHT1.v9 TDB, 10A8/UCHT1.v9 TDB ("10A8 TDB"), và kháng thể kháng gD/UCHT1.v9 TDB ("kháng thể kháng gD TDB"), và các tế bào biểu hiện FcRH5 của người có đuôi biểu hiện gD đầu tận cùng N. Phương pháp thấm tách đối với tổng số SLP76, là chỉ báo về quá trình truyền tín hiệu TCR, được sử dụng để xác nhận mức nạp mẫu ngang bằng.

Fig.23B là biểu đồ thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào đích FcRH5 bằng kháng thể 1G7/UCHT1.v9 TDB hoặc kháng thể kháng gD TDB và các tế bào T $CD8^+$.

Fig.23C là giản đồ về cấu trúc FcRH5 được cắt cụt có epitop gD đang gần màng.

Fig.23D là biểu đồ thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào đích bằng cách sử dụng cấu trúc FcRH5 được cắt cụt có kháng thể 1G7 TDB hoặc kháng thể kháng gD TDB. Hoạt tính của 1G7/UCHT1.v9 TDB gần đã tăng gấp 25 lần (EC50 = 20pM), và kháng thể kháng gD TDB có thể điều tiết một cách hữu hiệu việc tiêu diệt các tế bào (EC50 = 0,19nM) khi sự cản trở do ECD gây ra được loại bỏ. Cấu trúc đã được cắt cụt được biểu hiện ở các tế bào 293.

Fig.23E là biểu đồ thể hiện rằng khả năng tiêu diệt tế bào đích của năm FcRH5 TDB thay thế mà nhận biết epitop gần màng (các đường nét đứt) là tương đương với

khả năng tiêu diệt qua trung gian 1G7/UCHT1.v9 TDB và tốt hơn một cách đáng kể so với 10A8 TDB.

Fig.24A là biểu đồ chập của phép phân tích đếm tế bào theo dòng chảy của tế bào SVT2 ban đầu, tế bào gD-FcRH5 có chiều dài đầy đủ và tế bào gD-FcRH5-miền 9.

Fig.24B là biểu đồ thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào đích tính theo phần trăm bởi kháng thể kháng 1G7/UCHT1.v9 TDB, 2H7/ UCHT1.v9 TDB ("2H7 TDB"), 3G7/ UCHT1.v9 TDB ("3G7 TDB"), 10A8 TDB, và kháng thể kháng gD TDB.

Fig.25A là biểu đồ chập của sáu dòng tế bào (SVT2-vật truyền, SVT2-FcRH1, SVT2-FCRH2, SVT2-FcRH3, SVT2-FcRH4, và SVT2-FcRH5), thể hiện rằng 1G7.v85 TDB liên kết vào FcRH5, nhưng không liên kết vào các thành viên họ khác.

Fig.25B là biểu đồ chập của ba dòng tế bào (293 ban đầu, 293-FcRH5 có chiều dài đầy đủ, và 293-FcRH5-D9khuyết đoạn), thể hiện rằng 1G7.v85 TDB liên kết vào miền gần màng của FcRH5.

Fig.25C là biểu đồ chập của ba dòng tế bào (SVT2-vật truyền, SVT2-huFcRH5, và SVT2-FcRH5 của khỉ cyno), thể hiện rằng 1G7.v85 TDB liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno và FcRH5 của người.

Các hình vẽ Fig.26A-Fig.26D là các biểu đồ chập của ba dòng tế bào (SVT2-vật truyền, SVT2-huFcRH5, và SVT2-FcRH5 của khỉ cyno), thể hiện khả năng liên kết của 1G7/38E4.v1 TDB ("1G7 TDB") vào dòng tế bào đa u tủy (MM) và các tế bào sơ cấp. Các biểu đồ chập được thể hiện cho isotyp-PE và 1G7 TDB đối với các tế bào MOLP-2 (Fig.26A), các tế bào B CD20+ của người (Fig.26B), các tương bào CD38+CD138+ của người (Fig.26C), và các tế bào khối u MM CD38+CD138+ từ dịch chọc tủy xương MM (Fig.26D).

Fig.27A là biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa phụ thuộc vào liều lượng của các tế bào CD8+ sau khi kích thích bằng các tế bào đích (MOLP-2) và 1G7 TDB, được phát hiện bằng phép phân tích đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.27B là biểu đồ thể hiện khả năng tiêu diệt phụ thuộc vào tế bào đích của 1G7 TDB. Phần chèn vào thể hiện biểu đồ chập của phương pháp đếm tế bào theo

dòng chảy của dòng tế bào Fox-NY ban đầu và các dòng vô tính được chuyển nhiễm để biểu hiện FcRH5 của người ở mức thấp hoặc mức cao. Các vạch sai số là độ lệch chuẩn của các dạng lặp lại ba lần giống hệt.

Các hình vẽ Fig.27C-Fig.27E là các biểu đồ thể hiện rằng 1G7 TDB kích thích đáp ứng tăng sinh CD8 (5 ngày), như được phát hiện bằng cách đo mức độ loãng cường độ huỳnh quang CSFE bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Chỉ có các tế bào CD8+ của người được đánh dấu bằng CFSE (Fig.27C), nuôi cấy đồng thời với MOLP-2 (Fig.27D), hoặc nuôi cấy đồng thời với MOLP-2 và 1000 ng/ml 1G7.v85 TDB (Fig.27E).

Fig.27F là biểu đồ thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào phụ thuộc vào đích bằng FcRH5 TDB chứa các nhánh kháng CD3 khác nhau (ví dụ, UCHT1.v9, 38E4.v1, và 40G5c) (xem Công bố đơn PCT số WO 2015/095392 A1, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Mỗi trong số các nhánh kháng CD3 là 38E4.v1 (K_D có hóa trị một = 0,5nM, BIACORE®), UCHT1.v9 (K_D có hóa trị một = 2,5nM, BIACORE® và Scatchard), và 40G5c (K_D có hóa trị một = 51nM, BIACORE®) được ghép cặp với nhánh kháng FcRH5 của m1G7 (K_D = 11nm, BIACORE®) và được kiểm tra về khả năng liên kết vào các tế bào CD8+ đã tinh chế của người.

Fig.27G là biểu đồ thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào phụ thuộc vào đích bằng 1G7 TDB và 1G7/38E4.v1 bis-Fab ("1G7 bis-Fab").

Fig.28A là biểu đồ thể hiện quá trình biểu hiện FcRH5 ở các tế bào khối u bệnh đa u tủy nguyên phát, các tế bào B ngoại vi của đối tượng cho khỏe mạnh, và các tương bào tủy xương. Quá trình biểu hiện FcRH5 được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy và được chuẩn hóa theo mức biểu hiện ở đối chứng thử nghiệm và đối chứng nội tại MOLP-2. Mức tương đối của FcRH5 được tính toán như sau: (Số trung bình nhân của FcRH5 của "X"/Số trung bình nhân của đối chứng isotyp của "X")/ (Số trung bình nhân của FcRH5 của MOLP-2/Số trung bình nhân của đối chứng isotyp của MOLP-2).

Fig.28B là biểu đồ thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của 1G7.v85 TDB trên các tương bào của người. Các tế bào đơn nhân tủy xương (BMMC) của người được

nuôi cấy với 1G7.v85 TDB và số tế bào của CD38+CD138+ sống được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.28C là biểu đồ thể hiện hoạt tính gây độc tế bào của 1G7.v85 TDB trên các tế bào u tủy nguyên phát lấy từ bệnh nhân khác nhau. Các BMMC u tủy của người được nuôi cấy đồng thời với các tế bào T CD8+ được phân lập từ đối tượng cho khỏe mạnh và 1G7.v85 TBD.

Fig.28D là biểu đồ thể hiện rằng mức biểu hiện FcRH5 rất thấp trong các tế bào đích là đủ cho hoạt tính tiêu diệt công hiệu. Số bản sao FcRH5 trong mỗi tế bào được xác định bằng thử nghiệm Scatchard.

Fig.28E (bên trên) là biểu đồ thể hiện phép phân tích qRT-PCR về các mức ARN thông tin của FcRH5 trong các phần sinh thiết tủy xương từ các bệnh nhân u tủy nguy cơ cao có hiện tượng tăng 1q21. Mức biểu hiện ARN thông tin được tính toán bằng phương pháp delta Ct (dCt). Phép phân tích thống kê được thực hiện bằng cách sử dụng xét nghiệm U Mann-Whitney. (Bên dưới) là các hình ảnh của phép phân tích FISH trên các phần sinh thiết đa u tủy nguyên phát thể hiện dạng lưỡng bội bình thường của 1q21 (Trái) và hỗn hợp gồm khoảng từ ba đến sáu bản sao của 1q21 (Phải). Mẫu khối u được nhận diện ở dạng tăng 1q21 khi >20% tế bào khối u được tính điểm có ba hoặc nhiều hơn ba bản sao locus 1q21.3.

Fig.29A là biểu đồ chập của isotyp-PE và dòng vô tính kháng FcRH5 1G7-PE, trình bày sự biểu hiện của FcRH5 trên các tế bào B CD20+ của khỉ cyno.

Fig.29B là biểu đồ chập của isotyp-PE và dòng vô tính kháng FcRH5 1G7-PE, trình bày sự biểu hiện của FcRH5 ở khỉ cyno trên các tương bào CD45-CD20-CD38+PC+.

Các hình vẽ Fig.29C-Fig.29D là các biểu đồ thể hiện hoạt tính gây độc tế bào phụ thuộc vào liều lượng tương đương giữa tế bào T CD8+ của khỉ cyno và tế bào T CD8+ của người trong thử nghiệm tiêu diệt *in vitro* bằng cách sử dụng SVT2-cyno-FcRH5 (Fig.29C) và MOLP-2 (Fig.29D) với các tế bào T CD8+ của người hoặc các tế bào T CD8+ của khỉ cyno.

Fig.29E là biểu đồ thể hiện hoạt tính tiêu diệt *in vitro* của 1G7.v85 TDB trên các tế bào B CD20+ của khỉ cyno (n=14).

Fig.29F là biểu đồ thể hiện hoạt tính tiêu diệt *in vitro* của 1G7.v85 TDB trên các tương bào CD45-CD20-CD38+PC+ từ tủy xương của khỉ cyno từ tám đối tượng cho khác nhau (n=8).

Fig.30A là biểu đồ thể hiện rằng các tế bào T lá lách của người được phân lập từ lá lách của chuột nhắt NOD/SCID gamma (NSG) được biến đổi giống như của người có hoạt tính tương đương với các tế bào T ngoại vi của người từ các đối tượng cho khỏe mạnh.

Fig.30B là biểu đồ thể hiện rằng việc xử lý 1G7 TDB kích thích sự thoái triển của các khối u dị ghép MOLP-2 dưới da ở các con chuột nhắt NSG được biến đổi giống như của người. Các con chuột này được điều trị bằng một liều dùng trong tĩnh mạch duy nhất của chất dẫn thuốc hoặc 1G7.v85 TDB ở mức 0,5mg/kg. Thể tích khối u trung bình (đường nét đậm màu đen), các thể tích khối u riêng lẻ (các đường nét mảnh), và giá trị trung bình của nhóm đối chứng (đường nét đứt) được thể hiện.

Fig.31A là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết thanh của FcRH5 TDB được vẽ đồ thị trong suốt quá trình nghiên cứu sau khi cho ba con /nhóm dùng liều lượng duy nhất của 1G7.v85 TDB ở mức 1mg/kg, 2mg/kg, hoặc 4mg/kg. Bảng thể hiện các thông số dược động học được thể hiện dưới đây.

Fig.31B là biểu đồ thể hiện nồng độ trong huyết thanh của FcRH5 TDB (1G7.v85 TDB và 1G7.v87/38E4.v1 TDB ("1G7.v87 TDB")) được vẽ đồ thị trong suốt quá trình nghiên cứu sau khi cho ba con /nhóm dùng liều lượng duy nhất của kháng thể kháng gD TDB ở mức 3mg/kg hoặc FcRH5 TDB ở mức 0,3mg/kg hoặc 3mg/kg. Bảng thể hiện các thông số dược động học được thể hiện dưới đây.

Các hình vẽ Fig.31C-Fig.31D là các biểu đồ thể hiện mức hoạt hóa tế bào T nhất thời do 1G7.v85 TDB kích thích trong máu ngoại vi của khỉ cyno sau khi cho ba con/nhóm dùng trong tĩnh mạch liều lượng duy nhất của chất dẫn thuốc hoặc 1G7.v85 TDB (1mg/kg, 2mg/kg, hoặc 4mg/kg).

Các hình vẽ Fig.31E-Fig.31H là các biểu đồ thể hiện số lượng tuyệt đối của các tế bào B CD20+ trong máu ngoại vi (Fig.31E), lá lách (Fig.31F), hạch bạch huyết hàm dưới (Fig.31G), và tủy xương (Fig.31H) ở khỉ cyno sau khi cho ba con /nhóm dùng trong tĩnh mạch liều lượng duy nhất của chất dẫn thuốc hoặc 1G7.v85 TDB (1mg/kg, 2mg/kg, hoặc 4mg/kg). Các hình vẽ Fig.31F-Fig.31H được vẽ đồ thị với giá trị trung bình nhóm và sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình này (SEM).

Fig.31I là biểu đồ thể hiện rằng 1G7.v85 TDB làm tiêu tan các tương bào tủy xương ở khỉ cyno, với SEM đo được của nhóm được vẽ đồ thị.

Fig.31J là biểu đồ thể hiện sự thay đổi về đáp ứng mức IgG ở khỉ cyno đối với việc điều trị, được tính toán bằng cách sử dụng công thức {(mức IgG trước liều dùng) - (Mức IgG thời điểm kết thúc nghiên cứu)}/(mức IgG trước liều dùng) X 100. Độ chênh lệch giữa các kết quả trước liều dùng và sau khi điều trị được phân tích bằng xét nghiệm t không theo cặp. Dữ liệu này được vẽ đồ thị với giá trị trung bình nhóm và sai số tiêu chuẩn của giá trị trung bình này (SEM).

Các hình vẽ Fig.32A-Fig.32B là các biểu đồ thể hiện số lượng tuyệt đối của các tế bào T CD4+ trong máu ngoại vi (Fig.32A) và các tế bào T CD8+ (Fig.32B) trong bốn nhóm động vật sau khi cho dùng trong tĩnh mạch liều lượng duy nhất của chất dẫn thuốc, 1G7.v85 TDB ở mức 1mg/kg, 1G7.v85 TDB ở mức 2mg/kg, hoặc 1G7.v85 TDB ở mức 4mg/kg.

Fig.32C là biểu đồ thể hiện sự giảm số lượng tuyệt đối của các tế bào B CD20+ ở hạch bạch huyết màng treo ruột sau quá trình điều trị bằng 1G7.v85 TDB. Đồ thị được vẽ ở dạng các con vật riêng lẻ và nhóm trung bình có SEM.

Fig.32D là biểu đồ thể hiện mức chiếm giữ FcRH5 sau khi cho dùng trong tĩnh mạch liều lượng duy nhất của 1G7.v85 TDB ở mức 1mg/kg, 2mg/kg, hoặc 4mg/kg.

Các hình vẽ Fig.33A-Fig.33F là các biểu đồ thể hiện sự thay đổi về nồng độ của các xytokin IL-6 (Fig.33A), IL-2 (Fig.33B), IFN-γ (Fig.33C), IL-1Rα (Fig.33D), IL-5 (Fig.33E), và MCP-1 (Fig.33F) trong bốn nhóm động vật sau khi cho dùng trong tĩnh mạch liều lượng duy nhất của chất dẫn thuốc, 1G7.v85 TDB ở mức 1mg/kg, 1G7.v85 TDB ở mức 2mg/kg, và 1G7.v85 TDB ở mức 4mg/kg.

Fig.34 là một loạt các đồ thị thể hiện rằng việc điều trị 1G7.v85 TDB kích thích sự biểu hiện PD1 trong các tế bào T của người. Các tế bào T CD8+ được kích thích trong 48 giờ bằng 1G7.v85 TDB và tế bào MOLP-2 đích và sau đó được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

Fig.35A là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm của PD1+ trong các tế bào T CD8+ ở khỉ cyno sau khi cho dùng trong tĩnh mạch liều lượng duy nhất của chất dẫn thuốc, 1mg/kg, 2mg/kg, và 4mg/kg của 1G7.v85 TDB. Việc điều trị bằng 1G7.v85 TDB đem lại sự kích thích PD1 trong các tế bào T của khỉ cyno *in vivo*.

fig.35B là biểu đồ thể hiện tỷ lệ phần trăm của PD1+ trong các tế bào T CD4+ ở khỉ cyno sau khi cho dùng trong tĩnh mạch liều lượng duy nhất của chất dẫn thuốc, 1mg/kg, 2mg/kg, và 4mg/kg của 1G7.v85 TDB.

Các hình vẽ Fig.36A-Fig.36D là các đồ thị thể hiện mức biểu hiện PD-1 trong các tế bào T CD4+ từ máu (Fig.36A), các tế bào T CD8+ từ lá lách (Fig.36B), các tế bào T CD8+ từ hạch bạch huyết (Fig.36C), và các tế bào T CD8+ từ tủy xương (Fig.36D), như được phân tích bằng FACS bảy ngày sau khi cho dùng theo liều lượng 1G7.v85 TDB hoặc chất dẫn thuốc.

Các hình vẽ Fig.37A-Fig.37B là các biểu đồ thể hiện khả năng của 1G7.v85 TDB trong việc chuyển hướng hoạt tính của các tế bào T CD8+ được kích thích trước để tiêu diệt các tế bào HEK-293T biểu hiện FcRH5 và PD-1 ("các tế bào 293-FcRH5-PD-L1") khi có mặt hoặc thiếu vắng kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng thể kháng PD-1. Đường cong ở Fig.37A được vẽ biểu đồ với giá trị trung bình và sai số tiêu chuẩn (SD) của các dạng lặp lại ba lần giống hệt.

Fig.38A là biểu đồ thể hiện khả năng tiêu diệt tế bào đích SVT2-FcRH5 của 1G7.v85 TDB khi có mặt và khi thiếu vắng dexametason (Dex).

Fig.38B là một loạt các biểu đồ thể hiện sự giải phóng xytokin (tức là, IL-2, IL-6, TNF-α, và IFN-γ) sau khi điều trị bằng 1G7.v85 TDB khi có mặt và khi thiếu vắng Dex 1μM.

Fig.39 là hình vẽ dạng sơ đồ thể hiện quá trình sản sinh bis-Fab từ IgG1 của người.

Fig.40A là biểu đồ thể hiện khả năng liên kết FcRH5 của các bis-Fab A-D và $F(ab')_2$ A như được xác định bằng thử nghiệm ELISA.

Fig.40B là biểu đồ thể hiện khả năng liên kết CD3 của các bis-Fab A-D và $F(ab')_2$ A như được xác định bằng thử nghiệm ELISA.

Fig.41 là biểu đồ thể hiện lượng hoạt hóa tế bào T qua trung gian đích bởi các bis-Fab A-D và $F(ab')_2$ A.

Mô tả chi tiết sáng chế

I. Các định nghĩa

Thuật ngữ "khoảng" như được sử dụng trong bản mô tả này dùng để chỉ khoảng sai số thông thường dùng cho trị số tương ứng mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này dễ dàng biết được. Việc đề cập đến "khoảng" trị số hoặc thông số trong bản mô tả này bao gồm (và mô tả) các phương án mà hướng đến chính trị số hoặc thông số đó.

"Khung nhận của người" theo các mục đích trong bản mô tả này là khung bao gồm trình tự axit amin của khung miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) hoặc khung miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có nguồn gốc từ khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người, như được định nghĩa dưới đây. Khung nhận của người "có nguồn gốc từ" khung globulin miễn dịch của người hoặc khung liên ứng của người có thể bao gồm cùng một trình tự axit amin của chúng, hoặc nó có thể chứa các cải biến dạng thay đổi trình tự axit amin. Theo một số phương án, số cải biến dạng thay đổi axit amin là từ 10 trở xuống, 9 trở xuống, 8 trở xuống, 7 trở xuống, 6 trở xuống, 5 trở xuống, 4 trở xuống, 3 trở xuống, hoặc 2 trở xuống. Theo một số phương án, khung thụ thể của VL người đồng nhất về trình tự với trình tự khung globulin miễn dịch của VL người hoặc trình tự khung liên ứng của người.

"Ái lực" được dùng để chỉ độ mạnh của tổng toàn bộ các tương tác không cộng hóa trị giữa một vị trí liên kết đơn lẻ của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác liên kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi được chỉ định khác đi, như được sử dụng trong bản mô tả này, "ái lực liên kết" được dùng để chỉ ái lực liên kết nội tại mà phản ánh sự 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 tác Y của nó thường có thể được thể hiện bằng hằng số phân ly (K_D). Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm cả những loại được mô tả trong bản mô tả này. Các phương án làm ví dụ và minh họa cụ thể dùng để đo ái lực liên kết được mô tả ở dưới đây.

Kháng thể "được làm trưởng thành ái lực" được dùng để chỉ kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi ở một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR), so với kháng thể ban đầu không có các thay đổi đó, các thay đổi như vậy đem lại sự cải thiện về ái lực của kháng thể đối với kháng nguyên.

Thuật ngữ "kháng thể kháng FcRH5" hoặc "kháng thể liên kết vào FcRH5" được dùng để chỉ kháng thể có khả năng liên kết FcRH5 với đủ ái lực sao cho kháng thể này hữu ích trong vai trò là chất trị liệu và/hoặc chất chẩn đoán nhằm hướng đích đến FcRH5. Theo một phương án, mức độ liên kết của kháng thể kháng FcRH5 vào protein không FcRH5 không liên quan là nhỏ hơn khoảng 10% so với mức liên kết của kháng thể vào FcRH5 như đo được, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (radioimmunoassay-RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể liên kết vào FcRH5 có hằng số phân ly (K_D) $\leq$ 1μM, $\leq$ 100nM, $\leq$ 10nM, $\leq$ 1nM, $\leq$ 0,1nM, $\leq$ 0,01nM, hoặc $\leq$ 0,001nM (ví dụ, 10^{-8} M trở xuống, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào epitop của FcRH5 mà được bảo toàn trong số FcRH5 từ các loài khác nhau.

Các thuật ngữ "kháng thể kháng CD3" và "kháng thể liên kết vào CD3" được dùng để chỉ kháng thể có khả năng liên kết CD3 với đủ ái lực sao cho kháng thể này hữu ích trong vai trò là chất trị liệu và/hoặc chất chẩn đoán nhằm hướng đích đến CD3. Theo một phương án, mức độ liên kết của kháng thể kháng CD3 vào protein không CD3 không liên quan nhỏ hơn khoảng 10% mức liên kết của kháng thể vào CD3 như đo được, ví dụ, bằng thử nghiệm miễn dịch phóng xạ (RIA). Theo các phương án nhất định, kháng thể liên kết vào CD3 có hằng số phân ly (K_D) $\leq$ 1μM, $\leq$ 100nM, $\leq$ 10nM, $\leq$ 1nM, $\leq$ 0,1nM, $\leq$ 0,01nM, hoặc $\leq$ 0,001nM (ví dụ, 10^{-8} M trở xuống, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Theo các phương

án nhất định, kháng thể kháng CD3 liên kết vào epitop của CD3 mà được bảo toàn trong số CD3 từ các loài khác nhau.

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

"Mảnh kháng thể" được dùng để chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn mà bao gồm một phần của kháng thể nguyên vẹn liên kết kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn này liên kết vào đó. Các ví dụ về các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở bis-Fab; Fv; Fab; Fab, Fab'-SH; $F(ab')_2$; các kháng thể thể đôi; các kháng thể mạch thẳng; các phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv); và các kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Thuật ngữ "miền liên kết" có nghĩa là một phần của hợp chất hoặc phân tử mà liên kết một cách đặc hiệu vào epitop, kháng nguyên, phối tử, hoặc thụ thể đích. Các miền liên kết bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở các kháng thể (ví dụ, các kháng thể đơn dòng, đa dòng, tái tổ hợp, được biến đổi giống như của người, và thể khảm), các mảnh kháng thể hoặc các phần của chúng (ví dụ, các mảnh bis-Fab, các mảnh Fab, $F(ab')_2$, các kháng thể scFv, SMIP, các kháng thể miền, các kháng thể thể đôi, các tiểu kháng thể, scFv-Fc, các ái thể, các kháng thể nano, và miền VH và/hoặc miền VL của các kháng thể), các thụ thể, các phối tử, aptamer, và các phân tử khác có đối tác liên kết đã được nhận diện.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "vùng mang điện tích" được dùng để chỉ vị trí của polypeptit (ví dụ, kháng thể) mà bao gồm một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10) axit amin có tính bazơ hoặc axit amin có tính axit mà có khả năng tạo cặp điện tích với vùng mang điện tích cùng gốc có một hoặc nhiều (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10) axit amin có tính bazơ hoặc axit amin có tính axit, khi vùng mang điện tích này và vùng mang điện tích cùng gốc của nó có điện tích tương đối toàn phần đối ngược.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, thuật ngữ "cặp điện tích" được dùng để chỉ liên kết được tạo ra giữa hai vùng mang điện tích có điện tích toàn phần đối ngược.

"Chất hóa trị" là hợp chất hóa học hữu ích trong việc điều trị bệnh ung thư. Các ví dụ về chất hóa trị bao gồm các chất alkyl hóa như thiotepa và xyclosphosphamit (CYTOXAN®); các alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; các aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; các etylenimin và các metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenthiophosphoramit và trimetylomelamin; các axetogenin (đặc biệt là bulataxin và bulataxinon); delta-9-tetrahydrocannabinol (dronabinol, MARINOL®); beta-lapachon; lapachol; các colchixin; axit betulinic; camptothexin (bao gồm chất tương tự tổng hợp topotecan (HYCAMTIN®), CPT-11 (irinotecan, CAMPTOSAR®), axetylcamptothexin, scopolectin, và 9-aminocamptothexin); bryostatin; calystatin; CC-1065 (bao gồm các chất tương tự tổng hợp adozelesin, carzelesin và bizelesin của nó); podophylotoxin; axit podophylinic; teniposit; các cryptophyxin (cụ thể là cryptophyxin 1 và cryptophyxin 8); dolastatin; duocarmyxin (bao gồm các chất tương tự tổng hợp, KW-2189 và CB1-TM1); eleutherobin; pancratistatin; sarcodictyin; spongistatin; các mù tạt nitơ như clorambuxil, clornaphazin, clorophosphamit, estramustin, ifosfamit, mecloretamin, mecloretamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamit, mù tạt uraxil; các nitrosoure như carmustin, clorozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, và ranimnustin; các chất kháng sinh như các chất kháng sinh enediyne (ví dụ, calicheamixin, đặc biệt là calicheamixin gamma1I và calicheamixin omegaII (ví dụ, xem tài liệu: Nicolaou et al. *Angew. Chem Intl. Ed. Engl.* 33: 183-186, 1994); CDP323, chất ức chế alpha-4 integrin dùng qua đường miệng; dynemixin, bao gồm dynemixin A; esperamixin; cũng như chất mang màu neocarzinostatin và các chất mang màu kháng sinh enediyne cromoprotein liên quan), aclaxinomysin, actinomyxin, authramyxin, azaserin, bleomyxin, cactinomyxin, carabixin, caminomyxin, carzinophilin, cromomyxin, dactinomyxin, daunorubixin, detorubixin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubixin (bao gồm ADRIAMYCIN®, morpholino-doxorubixin, xyanomorpholino-doxorubixin, 2-pyrolino-doxorubixin,

thuốc tiêm liposom doxorubixin HCl (DOXIL®), doxorubixin liposom TLC D-99 (MYOCET®), doxorubixin liposom được peg hóa (CAELYX®), và deoxydoxorubixin), epirubixin, esorubixin, idarubixin, marxellomyxin, các mitomyxin như mitomyxin C, axit mycophenolic, nogalamyxin, olivomyxin, peplomyxin, porfiromyxin, puromyxin, quelamyxin, rodorubixin, streptonigrin, streptozoxin, tuberxidin, ubenimex, zinostatin, zorubixin; các chất chống chuyển hóa như metotrexat, gemxitabin (GEMZAR®), tegafur (UFTORAL®), capexitabin (XELODA®), epothilon, và 5-flouraxil (5-FU); combretastatin; các chất tương tự axit folic như denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; các chất đồng đẳng purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; các chất đồng đẳng pyrimidin như anxitabin, azacitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enoxitabin, floxuridin; các androgen như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; các chất kháng thượng thận như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; chất làm đầy axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; eniluraxil; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziquon; elformithin; elliptinium axetat; epothilon; etogluxid; gali nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidainin; các maytansinoit như maytansin và ansamitoxin; mitoguazon; mitoxantron; mopidanmol; nitraerin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; losoxantron; 2-etylhydrazit; procarbazin; phức chất polysacarit PSK® (JHS Natural Products, Eugene, Oreg.); razoxan; rhizoxin; sizofuran; spirogermani; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2',2'-triclotrietylamin; các trichothexen (đặc biệt là độc tố T-2, verracurin A, roridin A và anguidin); uretan; vindesin (ELDISINE®, FILDESIN®); dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit ("Ara-C"); thiotepa; taxoit, ví dụ, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.), dạng chế phẩm hạt nano được xử lý kỹ thuật bằng albumin của paclitaxel (ABRAXANE™), và doxetaxel (TAXOTERE®, Rhome-Poulene Rorer, Antony, Pháp); cloranbuxil; 6-thioguanin; mercaptopurin; metotrexat; các chất platin như xisplatin, oxaliplatin (ví dụ, ELOXATIN®), và carboplatin; vinca, chất này ngăn chặn việc polyme hóa tubulin sẽ tạo ra các vi quản, bao gồm vinblastin (VELBAN®), vincristin (ONCOVIN®), vindesin (ELDISINE®,

FILDESIN®), và vinorelbin (NAVELBINE®); etoposit (VP-16); ifosfamit; mitoxantron; leucovorin; novantron; edatrexat; daunomyxin; aminopterin; ibandronat; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornitin (DMFO); các retinoit như axit retinoic, bao gồm bexaroten (TARGRETIN®); các bisphosphonat như clodronat (ví dụ, BONEFOS® hoặc OSTAC®), etidronat (DIDROCAL®), NE-58095, axit zoledronic/zoledronat (ZOMETA®), alendronat (FOSAMAX®), pamidronat (AREDIA®), tiludronat (SKELID®), hoặc risedronat (ACTONEL®); troxaxitabin (chất đồng đẳng 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); các oligonucleotit đối nghĩa, cụ thể là những loại ức chế sự biểu hiện của các gen ở các con đường truyền tín hiệu liên can đến hiện tượng tăng sinh tế bào lệch lạc, như, ví dụ, PKC-alpha, Raf, H-Ras, và thụ thể yếu tố tăng trưởng biểu bì (epidermal growth factor receptor-EGF-R) (ví dụ, erlotinib (Tarceva™)); và VEGF-A mà làm giảm hiện tượng tăng sinh tế bào; các vacxin như vacxin THERATOPE® và các vacxin liệu pháp gen, ví dụ, vacxin ALLOVECTIN®, vacxin LEUVECTIN®, và vacxin VAXID®; chất ức chế topoisomeraza 1 (ví dụ, LURTOTECAN®); rmRH (ví dụ, ABARELIX®); BAY439006 (sorafenib; Bayer); SU-11248 (sunitinib, SUTENT®, Pfizer); perifosin, chất ức chế COX-2 (ví dụ, xelecoxib hoặc etoricoxib), chất ức chế proteosom (ví dụ, PS341); bortezomib (VELCADE®); CCI-779; tipifarnib (R11577); orafenib, ABT510; chất ức chế Bcl-2 như oblimersen natri (GENASENSE®); pixantron; chất ức chế EGFR; chất ức chế tyrosin kinaza; các chất ức chế serin-threonin kinaza như rapamyxin (sirolimus, RAPAMUNE®); các chất ức chế farnesyltransferaza như lonafarnib (SCH 6636, SARASAR™); và các muối dược dụng, các axit hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất trên đây; cũng như các dạng kết hợp của hai chất trở lên trong số các chất trên đây như CHOP, chữ viết tắt dùng cho liệu pháp kết hợp của xyclophosphamit, doxorubixin, vincristin, và prednisolon; và FOLFOX, chữ viết tắt dùng cho phác đồ điều trị bằng oxaliplatin (ELOXATIN™) kết hợp với 5-FU và leucovorin, và các muối dược dụng, các axit hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất trên đây; cũng như các dạng kết hợp của hai hoặc nhiều hơn hai chất trên đây.

Các chất hóa trị như được định nghĩa trong bản mô tả này bao gồm "các chất kháng hormon" hoặc "tác nhân trị liệu nội tiết" mà hoạt động để điều hòa, làm giảm,

phong bế, hoặc ức chế các tác động của hormon mà có thể thúc đẩy sự phát triển của bệnh ung thư. Chúng có thể chính là các hormon, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: các chất kháng estrogen và các chất điều biến thụ thể estrogen chọn lọc (selective estrogen receptor modulator-SERM), bao gồm, ví dụ, tamoxifen (bao gồm NOLVADEX® tamoxifen), raloxifen, droloxifen, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và FARESTON.cndot.toremifen; các chất ức chế aromataza mà ức chế enzym aromataza, chất này điều hòa quá trình sản xuất estrogen ở tuyến thượng thận, như, ví dụ, 4(5)-imidazol, aminoglutethimit, MEGASE® megestrol axetat, AROMASIN® exemestan, formestanie, fadrozol, RIVISOR® vorozol, FEMARA® letrozol, và ARIMIDEX® anastrozol; và các chất kháng androgen như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; cũng như troxaxitabin (chất đồng đẳng 1,3-dioxolan nucleosit xytosin); các oligonucleotit đối nghĩa, cụ thể là những loại ức chế sự biểu hiện của các gen ở các con đường truyền tín hiệu liên can đến hiện tượng tăng sinh tế bào lệch lạc, như, ví dụ, PKC-alpha, Raf và H-Ras; các ribozym như chất ức chế sự biểu hiện VEGF (ví dụ, ANGIOZYME® ribozym) và chất ức chế sự biểu hiện HER2; các vacxin như các vacxin liệu pháp gen, ví dụ, vacxin ALLOVECTIN®, vacxin LEUVECTIN®, và vacxin VAXID®; PROLEUKIN® rIL-2; chất ức chế topoisomeraza 1 LURTOTECAN®; ABARELIX® rmRH; Vinorelbin và Esperamixin (xem Patent Mỹ số 4675187), và các muối dược dụng, các axit hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất trên đây; cũng như các dạng kết hợp của hai hoặc nhiều hơn hai chất trên đây.

Thuật ngữ "thuốc điều biến miễn dịch" hoặc "IMiD" được dùng để chỉ nhóm gồm các thuốc cải biến đáp ứng của hệ miễn dịch hoặc hoạt động chức năng của hệ miễn dịch, như bằng cách kích thích việc tạo ra kháng thể và/hoặc ức chế hoạt tính tế bào máu ngoại vi, và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, talidomit (α-N-phtalimit-glutarimit) và các chất tương tự của nó, REVLIMID® (lenalidomit), ACTI-MID™ (pomalidomit), OTEZLA® (apremilast), và các muối dược dụng hoặc các axit của chúng.

Thuật ngữ kháng thể "thể khảm" được dùng để chỉ kháng thể mà trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được lấy từ một nguồn hoặc loài cụ thể, trong

khi phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được lấy từ một nguồn hoặc loài khác.

Thuật ngữ "FcRH5", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ FcRH5 nguyên thể bất kỳ là kết quả của quá trình sản xuất protein FcRH5 ở tế bào. Thuật ngữ này bao gồm FcRH5 từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như các động vật linh trưởng (ví dụ, con người và khỉ đuôi dài) và các động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của FcRH5, ví dụ, các biến thể ghép mã hoặc các biến thể alen. Trình tự axit amin của trình tự protein FcRH5 của người làm ví dụ được thể hiện ở SEQ ID NO: 114. Trình tự axit amin của protein FcRH5 của khỉ đuôi dài làm ví dụ được thể hiện ở SEQ ID NO: 215.

Thuật ngữ "cụm biệt hóa 3" hay "CD3", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ CD3 nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như các động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và các động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác, bao gồm, ví dụ, các chuỗi CD3ε, CD3γ, CD3α, và CD3β. Thuật ngữ này bao gồm cả CD3 chưa được xử lý có "chiều dài đầy đủ", (ví dụ, CD3ε hoặc CD3γ chưa được xử lý hoặc chưa được cải biến), cũng như dạng bất kỳ của CD3 là kết quả của quá trình xử lý ở tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của CD3, bao gồm, ví dụ, các biến thể ghép mã hoặc các biến thể alen. CD3 bao gồm, ví dụ, protein CD3ε của người (NCBI RefSeq No. NP_000724), protein này có độ dài 207 axit amin, và protein CD3γ của người (NCBI RefSeq No. NP_000064), protein này có độ dài 182 axit amin.

"Lớp" kháng thể được dùng để chỉ loại miền hằng định hoặc vùng hằng định do chuỗi nặng của nó sở hữu. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG, và IgM, và một vài trong số đó còn được chia nhỏ hơn thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG_1, IgG_2, IgG_3, IgG_4, IgA_1, và IgA_2. Các miền hằng định chuỗi nặng mà tương ứng với các lớp khác nhau của các globulin miễn dịch lần lượt được gọi là α, δ, ε, γ và μ.

Cần phải hiểu rằng các khía cạnh và các phương án của sáng chế được mô tả trong bản mô tả này bao gồm "bao gồm", "gồm", và "về cơ bản gồm" các khía cạnh và các phương án.

Thuật ngữ "chất gây độc tế bào" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngăn chặn chức năng tế bào và/hoặc gây chết tế bào hoặc phá hủy tế bào. Các chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ (ví dụ, At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu); các dược chất hoặc các chất hóa trị (ví dụ, metotrexat, adriamixin, vinca alkaloit (vincristin, vinblastin, etoposit), doxorubixin, melphalan, mitomyxin C, clorambuxil, daunorubixin hoặc các chất xen giữa khác); các chất ức chế tăng trưởng; các enzym và các mảnh của chúng như các enzym thủy phân axit nucleic; các chất kháng sinh; các độc tố như các độc tố phân tử nhỏ hoặc các độc tố có hoạt tính theo kiểu enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các mảnh và/hoặc các biến thể của chúng; và các chất chống ung thư hoặc chống khối u khác nhau được bộc lộ dưới đây.

"Rối loạn" là tình trạng bất kỳ sẽ được lợi từ việc điều trị bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các rối loạn hoặc bệnh cấp tính và mạn tính bao gồm các tình trạng bệnh lý mà làm cho động vật có vú mắc rối loạn đang nói đến.

Các thuật ngữ "rối loạn tăng sinh tế bào" và "rối loạn tăng sinh" được dùng để chỉ các rối loạn liên quan đến một số mức độ tăng sinh tế bào bất thường. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào này là bệnh ung thư. Theo một phương án, rối loạn tăng sinh tế bào này là khối u.

Các thuật ngữ "bệnh ung thư" và "có bệnh ung thư" được dùng để chỉ hoặc mô tả tình trạng sinh lý ở các động vật có vú mà thường đặc trưng bởi sự tăng sinh/tăng trưởng tế bào không điều hòa được. Các ví dụ về bệnh ung thư bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, u tủy, ung thư biểu mô, u bạch huyết (ví dụ, u bạch huyết Hodgkin và u bạch huyết không phải Hodgkin), u nguyên bào, ung thư mô trung bì, và bệnh bạch cầu. Theo một số phương án, bệnh ung thư này là bệnh ung thư dương tính với FcRH5. Các ví dụ cụ thể khác về bệnh ung thư như vậy bao gồm bệnh đa u

tủy (MM), bệnh bạch cầu dạng bạch huyết mạn tính (CLL), u bạch huyết tế bào áo nang (MCL), u bạch huyết tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), u bạch huyết thể nang (FL), bệnh bạch cầu dạng tủy cấp tính (AML), hội chứng loạn sản tủy (MDS), bệnh bạch cầu phát sinh từ tủy xương mạn tính (CML), bệnh bạch cầu tủy bào-bạch cầu đơn nhân to mạn tính, bệnh bạch cầu dạng tiền tủy bào cấp tính (APL), rối loạn tăng sinh tủy mạn tính, bệnh bạch cầu tiểu cầu, bệnh bạch cầu dạng nguyên bào bạch huyết tế bào B tiền thể cấp tính (pre-B-ALL), bệnh bạch cầu dạng nguyên bào bạch huyết tế bào T tiền thể cấp tính (pre-T-ALL), bệnh dưỡng bào, bệnh bạch cầu dưỡng bào, ung thư mô trung bì dưỡng bào, ung thư mô trung bì dạng tủy, bệnh bạch cầu dạng bạch huyết, và bệnh bạch cầu tế bào chưa biệt hóa. Theo một số phương án, bệnh ung thư này là ung thư tế bào B. Cụ thể là, bệnh ung thư có thể bao gồm các tình trạng liên can đến sự sản sinh kháng thể quá mức, như tăng sinh bất thường globulin miễn dịch đơn dòng, tích tụ dạng tinh bột chuỗi nhẹ, tăng sinh bất thường globulin miễn dịch đơn dòng có ý nghĩa chưa xác định được và u tương bào đơn độc, u tương bào biệt lập và u tương bào ngoài tủy xương.

"Khối u", như được sử dụng trong bản mô tả này, dùng để chỉ tất cả sự tăng trưởng và tăng sinh tế bào tân sinh, dù là ác tính hay lành tính, và tất cả các mô và tế bào tiền ung thư và ung thư. Các thuật ngữ "bệnh ung thư", "có bệnh ung thư", "rối loạn tăng sinh tế bào", "rối loạn tăng sinh" và "khối u" không có tính loại trừ lẫn nhau khi được đề cập đến trong bản mô tả này.

"Các chức năng tác động" được dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, hoạt tính này thay đổi theo isotyp kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác động kháng thể bao gồm: khả năng liên kết C1q và độc tính tế bào phụ thuộc vào bổ thể (complement dependent cytotoxicity-CDC); khả năng liên kết thụ thể Fc; độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể qua trung gian tế bào (ADCC); khả năng thực bào; khả năng điều hòa giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và khả năng hoạt hóa tế bào B.

"Lượng hữu hiệu" của một hợp chất, ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế hoặc chế phẩm (ví dụ, dược phẩm) của nó, ít nhất là lượng tối thiểu cần để đạt được kết quả chữa bệnh hoặc kết quả phòng bệnh mong muốn, như mức cải thiện

hoặc phòng ngừa có thể đo được của một rối loạn cụ thể (ví dụ, rối loạn tăng sinh tế bào, ví dụ, bệnh ung thư). Lượng hữu hiệu trong bản mô tả này có thể thay đổi theo các yếu tố như tình trạng bệnh, độ tuổi, giới tính, và trọng lượng của bệnh nhân, và khả năng của kháng thể trong việc tạo ra đáp ứng mong muốn ở cá thể. Lượng hữu hiệu cũng là lượng mà trong đó tác động độc hại hoặc tác động có hại bất kỳ của việc điều trị bị lấn át bởi các tác dụng có lợi về mặt trị liệu. Đối với việc sử dụng phòng bệnh, các kết quả mong muốn hoặc có lợi bao gồm các kết quả như loại bỏ hoặc làm giảm nguy cơ, giảm nhẹ mức độ trầm trọng, hoặc trì hoãn sự khởi phát của bệnh, bao gồm triệu chứng hóa sinh, triệu chứng mô học và/hoặc triệu chứng hành vi của bệnh, các biến chứng của nó, và các kiểu hình bệnh lý trung gian biểu hiện trong suốt quá trình phát triển của bệnh. Đối với việc sử dụng chữa bệnh, các kết quả mong muốn hoặc có lợi bao gồm các kết quả lâm sàng như làm giảm một hoặc nhiều triệu chứng là kết quả của bệnh, làm tăng chất lượng cuộc sống của những người mắc bệnh, làm giảm liều lượng của các thuốc khác cần để điều trị bệnh, tăng cường tác dụng của thuốc khác như thông qua việc hướng đích đến, trì hoãn sự tiến triển của bệnh, và/hoặc kéo dài thời gian sống. Trong trường hợp bệnh ung thư hoặc khối u, lượng hữu hiệu của thuốc có thể có tác dụng trong việc làm giảm số lượng tế bào ung thư; làm giảm kích cỡ khối u; ức chế (tức là, làm chậm đến một mức độ nào đó hoặc ngừng lại theo ý muốn) việc tế bào ung thư xâm nhiễm vào các cơ quan ngoại vi; ức chế (tức là, làm chậm đến một mức độ nào đó và ngừng lại theo ý muốn) sự di căn của khối u; ức chế đến một mức độ nào đó sự tăng trưởng của khối u; và/hoặc giảm bớt đến một mức độ nào đó một hoặc nhiều triệu chứng trong số các triệu chứng gắn liền với rối loạn này. Lượng hữu hiệu có thể được cho dùng trong một hoặc nhiều lần dùng. Vì các mục đích của sáng chế này, lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm là lượng đủ để thực hiện việc điều trị phòng bệnh hoặc việc điều trị chữa bệnh một cách trực tiếp hoặc gián tiếp. Như được hiểu trong bối cảnh lâm sàng, có thể đạt được hoặc có thể không đạt được lượng hữu hiệu của thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm chung với một thuốc, hợp chất, hoặc dược phẩm khác. Vì vậy, "lượng hữu hiệu" có thể được xem xét trong bối cảnh dùng một hoặc nhiều chất trị liệu, và một chất đơn lẻ có thể được xem là được cho dùng với lượng hữu hiệu nếu, khi dùng

chung với một hoặc nhiều chất khác, thì đạt được hoặc có thể đạt được kết quả mong muốn.

Thuật ngữ "vùng Fc" trong bản mô tả này được sử dụng để định nghĩa vùng đầu tận cùng C của chuỗi nặng của globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần của vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc trình tự nguyên thể và các biến thể vùng Fc. Theo một phương án, vùng Fc của chuỗi nặng IgG người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận cùng carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận cùng C (Lys447) của vùng Fc có thể có mặt hoặc có thể không có mặt. Trừ khi được chỉ rõ khác đi trong bản mô tả này, phương pháp đánh số các gốc axit amin trong vùng Fc hoặc vùng hằng định là theo hệ thống đánh số Châu Âu, còn được gọi là chỉ số EU, như được mô tả trong tài liệu: Kabat *et al. Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD, 1991.

"Khung" hay "FR" được dùng để chỉ các gốc miền biến đổi không phải là các gốc vùng siêu biến (HVR). Nhìn chung, FR của miền biến đổi gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3, và FR4. Do vậy, trình tự HVR và trình tự FR thường xuất hiện trong trình tự dưới đây ở VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Thuật ngữ "tế bào dương tính với FcRH5" được dùng để chỉ tế bào biểu hiện FcRH5 trên bề mặt của nó. Theo một số phương án, FcRH5 là một hoặc nhiều trong số FcRH5a, FcRH5b, FcRH5c, Yếu tố nhận diện theo UniProt Q96RD9-2, và/hoặc FcRH5d. Theo một số phương án, FcRH5 này là FcRH5c.

Thuật ngữ "ung thư dương tính với FcRH5" được dùng để chỉ bệnh ung thư bao gồm các tế bào biểu hiện FcRH5 trên bề mặt của chúng. Nhằm mục đích xác định xem liệu tế bào có biểu hiện FcRH5 trên bề mặt hay không, thì sự biểu hiện ARN thông tin của FcRH5 được xem là có tương quan với sự biểu hiện FcRH5 trên bề mặt tế bào. Theo một số phương án, sự biểu hiện của ARN thông tin của FcRH5 được xác định bằng phương pháp được chọn từ phương pháp lai *in situ* và RT-PCR (bao gồm cả RT-PCR định lượng). Theo cách khác, sự biểu hiện của FcRH5 trên bề mặt tế bào có thể được xác định, ví dụ, bằng cách sử dụng các kháng thể đối với FcRH5 trong phương pháp như hóa mô miễn dịch, FACS, v.v.. Theo một số phương

án, FcRH5 là một hoặc nhiều trong số FcRH5a, FcRH5b, FcRH5c, Yếu tố nhận diện theo UniProt Q96RD9-2, và/hoặc FcRH5d. Theo một số phương án, FcRH5 này là FcRH5c.

Các thuật ngữ "kháng thể có chiều dài đầy đủ", "kháng thể nguyên vẹn", và "kháng thể nguyên" được sử dụng trong bản mô tả này thay thế cho nhau để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản tương tự với cấu trúc kháng thể nguyên thể hoặc có các chuỗi nặng chứa vùng Fc như được định nghĩa trong bản mô tả này.

Thuật ngữ "các dạng được glycosyl hóa của FcRH5" được dùng để chỉ các dạng có trong tự nhiên của FcRH5 mà được cải biến sau dịch mã bằng cách bổ sung các gốc carbohydrat.

"Chất ức chế tăng trưởng" khi được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ hợp chất hoặc chế phẩm mà ức chế sự tăng trưởng của tế bào *in vitro* hoặc *in vivo*. Theo một phương án, chất ức chế tăng trưởng là kháng thể ức chế sự tăng trưởng mà ngăn chặn hoặc làm giảm sự tăng sinh của tế bào biểu hiện kháng nguyên mà kháng thể này liên kết vào đó. Theo một phương án khác, chất ức chế tăng trưởng có thể là chất làm giảm một cách đáng kể tỷ lệ phần trăm của các tế bào trong pha S. Các ví dụ về chất ức chế tăng trưởng bao gồm các chất ngăn chặn sự tiến triển chu kỳ tế bào (ở nơi không phải là pha S), như các chất kích thích sự kìm hãm G1 và kìm hãm pha M. Các chất phong bế pha M cổ điển bao gồm vinca (vincristin và vinblastin), taxan, và các chất ức chế topoisomeraza II như doxorubixin, epirubixin, daunorubixin, etoposit, và bleomyxin. Các chất kìm hãm G1 cũng lan tràn sang kìm hãm pha S, ví dụ, các chất alkyl hóa ADN như tamoxifen, prednison, dacarbazin, mecloretamin, cisplatin, metotrexat, 5-flouraxil, và ara-C. Có thể tìm thấy thông tin thêm trong tài liệu: Mendelsohn and Israel, eds., The Molecular Basis of Cancer, Chapter 1, có nhan đề "Cell cycle regulation, oncogenes, and antineoplastic drugs" do Murakami et al. (W.B. Saunders, Philadelphia, 1995), ví dụ, trang 13. Các taxan (paclitaxel và doxetaxel) là các thuốc chống ung thư, cả hai đều có nguồn gốc từ cây thủy tùng. Doxetaxel (TAXOTERE®, Rhone-Poulenc Rorer), có nguồn gốc từ cây thủy tùng Châu Âu, là chất tương tự bán tổng hợp của paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb). Paclitaxel và doxetaxel thúc đẩy quá trình lắp ráp các vi quản từ các

dime tubulin và làm ổn định các vi quản này bằng cách ngăn chặn quá trình khử polyme, điều này giúp ức chế hiện tượng phân bào ở các tế bào.

Các thuật ngữ "tế bào chủ", "dòng tế bào chủ", và "giống cấy tế bào chủ" được sử dụng thay thế cho nhau và được dùng để chỉ các tế bào mà axit nucleic ngoại sinh đã được đưa vào đó, bao gồm cả thế hệ con của các tế bào như vậy. Các tế bào chủ bao gồm "các thể biến nạp" và "các tế bào được biến nạp", mà bao gồm tế bào đã được biến nạp sơ cấp và thế hệ con có nguồn gốc từ đó bất kể số lần cấy chuyển. Thế hệ con có thể không đồng nhất hoàn toàn về hàm lượng axit nucleic với tế bào bố mẹ, mà có thể chứa các đột biến. Thế hệ con đột biến mà có cùng một chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc được chọn lọc trong tế bào đã được biến nạp ban đầu cũng bao gồm trong bản mô tả này.

"Kháng thể của người" là kháng thể sở hữu trình tự axit amin tương ứng với trình tự axit amin của kháng thể được tạo ra bởi con người hoặc tế bào người hoặc thu được từ nguồn không phải người mà sử dụng kho kháng thể của người hoặc các trình tự mã hóa kháng thể của người khác. Định nghĩa này về kháng thể của người loại trừ một cách cụ thể kháng thể được biến đổi giống như của người bao gồm các gốc liên kết kháng nguyên không phải của người. Các kháng thể của người có thể được sản xuất bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này, bao gồm các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn. Hoogenboom and Winter. *J. Mol. Biol.* 227:381,1991; Marks et al. *J. Mol. Biol.* 222:581,1991. Cũng sẵn có để điều chế các kháng thể đơn dòng của người là các phương pháp được mô tả trong tài liệu: Cole *et al. Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy*, Alan R. Liss, p. 77 (1985); Boerner et al. *J. Immunol.*, 147(1):86-95,1991. Xem thêm tài liệu: van Dijk and van de Winkel. *Curr. Opin. Pharmacol.* 5:368-74, 2001. Các kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách cho động vật chuyển gen đã biến đổi dùng kháng nguyên để tạo ra các kháng thể như vậy đáp ứng lại thử thách kháng nguyên, nhưng locus gen nội sinh của nó đã được làm bất hoạt, ví dụ, chuột chuyển gen được gây miễn dịch (ví dụ, xem tài liệu: các Patent Mỹ số 6075181 và 6150584 liên quan đến công nghệ XENOMOUSE™). Ví dụ, xem thêm: Li *et al. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.*

103:3557-3562, 2006 liên quan đến các kháng thể của người được tạo ra thông qua công nghệ tế bào lai tế bào B của người.

"Khung liên ứng của người" là khung thể hiện các gốc axit amin thường có nhất trong việc chọn lọc các trình tự khung VL hoặc VH của globulin miễn dịch của người. Nhìn chung, việc chọn lọc các trình tự VL hoặc VH của globulin miễn dịch của người là từ phân nhóm của các trình tự miền biến đổi. Nhìn chung, phân nhóm của các trình tự là phân nhóm như trong tài liệu: Kabat et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, Fifth Edition, NIH Publication 91-3242, Bethesda MD (1991), vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như trong tài liệu: Kabat et al. trên đây. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như trong tài liệu: Kabat et al. trên đây.

Kháng thể "được biến đổi giống như của người" được dùng để chỉ kháng thể thể khảm bao gồm các gốc axit amin từ HVR không phải của người và các gốc axit amin từ FR của người. Theo các phương án nhất định, kháng thể được biến đổi giống như của người về cơ bản sẽ bao gồm tất cả trong số ít nhất là một, và thông thường hai, miền biến đổi, mà trong đó tất cả hoặc về cơ bản tất cả các HVR (ví dụ, các CDR) tương ứng với các HVR của kháng thể không phải của người, và tất cả hoặc về cơ bản tất cả các FR tương ứng với các FR của kháng thể của người. Kháng thể được biến đổi giống như của người tùy ý có thể bao gồm ít nhất một phần vùng hằng định của kháng thể có nguồn gốc từ kháng thể của người. "Dạng được biến đổi giống như của người" của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, được dùng để chỉ kháng thể đã trải qua quá trình biến đổi giống như của người.

Thuật ngữ "vùng siêu biến" hay "HVR" như được sử dụng trong bản mô tả này được dùng để chỉ mỗi trong số các vùng của miền biến đổi của kháng thể mà siêu biến ở trình tự ("các vùng quyết định tính bổ trợ" hay "CDR") và/hoặc tạo ra các vòng được xác định về mặt cấu trúc ("các vòng siêu biến") và/hoặc chứa các gốc tiếp xúc kháng nguyên ("các dạng tiếp xúc kháng nguyên"). Nhìn chung, các kháng thể bao gồm sáu HVR: ba ở VH (H1, H2, H3), và ba ở VL (L1, L2, L3). Các HVR làm ví dụ trong bản mô tả này bao gồm:

(a) các vòng siêu biến xuất hiện 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 and Lesk, *J. Mol. Biol.* 196:901-917, 1987);

(b) các CDR xuất hiện 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 et al. *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th Ed. Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991));

(c) các dạng tiếp xúc kháng nguyên xuất hiện 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) các dạng kết hợp của (a), (b), và/hoặc (c), bao gồm các gốc HVR 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 et al. trên đây.

"Thể tiếp hợp miễn dịch" là kháng thể được tiếp hợp vào một hoặc nhiều (các) phân tử khác nguồn gốc, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở chất gây độc tế bào.

"Đối tượng" hoặc "cá thể" là động vật có vú. Các động vật có vú bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các động vật đã được thuần hóa (ví dụ, bò, cừu, mèo, chó, và ngựa), các động vật linh trưởng (ví dụ, con người và các động vật linh trưởng không phải người như khỉ), thỏ, và các động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống). Theo các phương án nhất định, đối tượng hoặc cá thể này là con người.

Kháng thể "được phân lập" là kháng thể đã được tách khỏi hợp phần trong môi trường tự nhiên của nó. Theo một số phương án, kháng thể được tinh chế đến độ tinh khiết lớn hơn 95% hoặc 99% như được xác định bằng, ví dụ, phương pháp điện di (ví dụ, SDS-PAGE, điện di hội tụ đẳng điện (isoelectric focusing-IEF), điện di mao quản) hoặc phương pháp sắc ký (ví dụ, HPLC pha đảo hoặc trao đổi ion). Để tìm hiểu về các phương pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Flatman et al. *J. Chromatogr. B* 848:79-87, 2007.

Axit nucleic "được phân lập" được dùng để chỉ phân tử axit nucleic đã được tách khỏi hợp phần trong 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, nhưng phân tử axit nucleic này có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc ở vị trí nhiễm sắc thể khác với vị trí nhiễm sắc thể tự nhiên của nó.

"Axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể kháng FcRH5" được dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc các mảnh của chúng), bao gồm (các) phân tử axit nucleic như vậy trong một vật truyền đơn lẻ hoặc các vật truyền tách biệt, và (các) phân tử axit nucleic như vậy có mặt ở một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

"Axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể kháng CD3" được dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể (hoặc các mảnh của chúng), bao gồm (các) phân tử axit nucleic như vậy trong một vật truyền đơn lẻ hoặc các vật truyền tách biệt, và (các) phân tử axit nucleic như vậy 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 được dùng để chỉ kháng thể thu được từ quần thể gồm các kháng thể về cơ bản thuần nhất, tức là, các kháng thể riêng biệt bao gồm quần thể này là đồng nhất và/hoặc liên kết cùng một epitop, ngoại trừ các kháng thể biến thể có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong suốt quá trình sản xuất chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể như vậy thường có mặt với lượng nhỏ. Trái ngược với các chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường bao gồm các kháng thể khác nhau được định hướng kháng các quyết định tố (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng được định hướng kháng một quyết định tố đơn lẻ trên kháng nguyên. Vì vậy, từ bổ nghĩa "đơn dòng" biểu lộ đặc tính của kháng thể là thu được từ quần thể về cơ bản thuần nhất của các kháng thể, và không được hiểu là cần đến việc sản xuất kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, các kháng thể đơn dòng sẽ được sử dụng theo sáng chế này có thể được tạo ra bằng một loạt kỹ thuật, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở phương pháp tế bào lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và các phương pháp sử dụng

các động vật chuyển gen chứa tất cả hoặc một phần của locus gen globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp làm ví dụ khác dùng để tạo các kháng thể đơn dòng được mô tả trong bản mô tả này.

"Kháng thể trần" được dùng để chỉ kháng thể không được tiếp hợp vào gốc khác nguồn gốc (ví dụ, gốc gây độc tế bào) hoặc chất đánh dấu phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt trong dược phẩm.

"Các kháng thể nguyên thể" được dùng để chỉ các phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên có các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, các kháng thể IgG nguyên thể là các glycoprotein dạng heterotetrame khoảng 150.000 dalton, bao gồm hai chuỗi nhẹ đồng nhất và hai chuỗi nặng đồng nhất mà được liên kết bằng disulfua. Từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nặng có vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền chuỗi nặng biến đổi hay miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba miền hằng định (CH1, CH2 và CH3). Tương tự, từ đầu tận cùng N đến đầu tận cùng C, mỗi chuỗi nhẹ có vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền chuỗi nhẹ biến đổi hay miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là miền chuỗi nhẹ hằng định (CL). Chuỗi nhẹ của kháng thể có thể được gán vào một trong hai loại, được gọi là kappa (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 chỉ các hướng dẫn thường nằm trong các gói sản phẩm trị liệu bán trên thị trường, mà chứa thông tin về các chỉ định, công dụng, liều lượng, phương thức dùng, liệu pháp kết hợp, các chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng các sản phẩm trị liệu đó.

Thuật ngữ "chất đối kháng liên kết trục PD-1"dùng để chỉ phân tử ức chế sự tương tác của đối tác liên kết trục PD-1 với một hoặc nhiều đối tác liên kết của nó, để loại bỏ tình trạng loạn chức năng tế bào T do truyền tín hiệu trên trục truyền tín hiệu PD-1 – với kết quả là phục hồi hoặc tăng cường chức năng của tế bào T (ví dụ, tăng sinh, sản xuất xytokin, tiêu diệt tế bào đích). Như được sử dụng trong bản mô tả này, chất đối kháng liên kết trục PD-1 bao gồm chất đối kháng liên kết PD-1, chất đối kháng liên kết PD-L1 và chất đối kháng liên kết PD-L2.

Thuật ngữ "chất đối kháng liên kết PD-1" được dùng để chỉ phân tử làm giảm, phong bế, ức chế, hủy bỏ hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu do sự tương tác của

PD-1 với một hoặc nhiều đối tác trong số các đối tác liên kết của nó, như PD-L1, PD-L2. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-1 là phân tử ức chế khả năng liên kết của PD-1 vào một hoặc nhiều đối tác trong số các đối tác liên kết của nó. Theo một phương án cụ thể, chất đối kháng liên kết PD-1 ức chế khả năng liên kết của PD-1 vào PD-L1 và/hoặc PD-L2. Ví dụ, các chất đối kháng liên kết PD-1 bao gồm các kháng thể kháng PD-1, các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, các chất kết dính miễn dịch, protein dung hợp, các oligopeptit và các phân tử khác mà làm giảm, phong bế, ức chế, hủy bỏ hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu do sự tương tác của PD-1 với PD-L1 và/hoặc PD-L2. Theo một phương án, chất đối kháng liên kết PD-1 làm giảm tín hiệu đồng kích thích âm tính được điều tiết bởi hoặc thông qua các protein bề mặt tế bào được biểu hiện trên bạch huyết bào T được điều tiết sự truyền tín hiệu thông qua PD-1 để làm cho tế bào T loạn chức năng trở nên ít loạn chức năng hơn (ví dụ, tăng cường các đáp ứng tác động đối với quá trình nhận biết kháng nguyên). Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-1 là kháng thể kháng PD-1. Theo một phương án cụ thể, chất đối kháng liên kết PD-1 là MDX-1106 (nivolumab). Theo một phương án cụ thể khác, chất đối kháng liên kết PD-1 là MK-3475 (pembrolizumab). Theo một phương án cụ thể khác, chất đối kháng liên kết PD-1 là CT-011 (pidilizumab). Theo một phương án cụ thể khác, chất đối kháng liên kết PD-1 là AMP-224. Theo một phương án cụ thể khác, chất đối kháng liên kết PD-1 là MED1-0680. Theo một phương án cụ thể khác, chất đối kháng liên kết PD-1 là PDR001. Theo một phương án cụ thể khác, chất đối kháng liên kết PD-1 là REGN2810. Theo một phương án cụ thể khác, chất đối kháng liên kết PD-1 là BGB-108.

Thuật ngữ "chất đối kháng liên kết PD-L1" được dùng để chỉ phân tử làm giảm, phong bế, ức chế, hủy bỏ hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu do sự tương tác của PD-L1 với một hoặc nhiều đối tác trong số các đối tác liên kết của nó, như PD-1, B7-1. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-L1 là phân tử ức chế khả năng liên kết của PD-L1 vào các đối tác liên kết của nó. Theo một phương án cụ thể, chất đối kháng liên kết PD-L1 ức chế khả năng liên kết của PD-L1 vào PD-1 và/hoặc B7-1. Theo một số phương án, các chất đối kháng liên kết PD-L1 bao gồm các kháng thể kháng PD-L1, các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, các chất kết

dính miễn dịch, protein dung hợp, các oligopeptit và các phân tử khác mà làm giảm, phong bế, ức chế, hủy bỏ hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu do sự tương tác của PD-L1 với một hoặc nhiều đối tác trong số các đối tác liên kết của nó, như PD-1, B7-1. Theo một phương án, chất đối kháng liên kết PD-L1 làm giảm tín hiệu đồng kích thích âm tính được điều tiết bởi hoặc thông qua các protein bề mặt tế bào được biểu hiện trên bạch huyết bào T được điều tiết việc truyền tín hiệu thông qua PD-L1 để làm cho tế bào T loạn chức năng trở nên ít loạn chức năng hơn (ví dụ, tăng cường các đáp ứng tác động đối với quá trình nhận biết kháng nguyên). Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-L1 là kháng thể kháng PD-L1. Theo một phương án cụ thể khác nữa, kháng thể kháng PD-L1 là MPDL3280A (atezolizumab, được đưa ra thị trường với tên là TECENTRIQ™ với WHO Drug Information (International Nonproprietary Names for Pharmaceutical Substances), Recommended INN: List 74, Vol. 29, No. 3, 2015 (xem trang 387)). Theo một phương án cụ thể, kháng thể kháng PD-L1 là YW243.55.S70. Theo một phương án cụ thể khác, kháng thể kháng PD-L1 là MDX-1105. Theo một phương án cụ thể khác, kháng thể kháng PD-L1 là MSB0015718C. Theo một phương án cụ thể khác nữa, kháng thể kháng PD-L1 là MEDI4736.

Thuật ngữ "chất đối kháng liên kết PD-L2" được dùng để chỉ phân tử làm giảm, phong bế, ức chế, hủy bỏ hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu do sự tương tác của PD-L2 với một hoặc nhiều đối tác trong số các đối tác liên kết của nó, như PD-1. Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-L2 là phân tử ức chế khả năng liên kết của PD-L2 vào một hoặc nhiều đối tác trong số các đối tác liên kết của nó. Theo một phương án cụ thể, chất đối kháng liên kết PD-L2 ức chế khả năng liên kết của PD-L2 vào PD-1. Theo một số phương án, các chất đối kháng PD-L2 bao gồm các kháng thể kháng PD-L2, các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng, các chất kết dính miễn dịch, protein dung hợp, các oligopeptit và các phân tử khác mà làm giảm, phong bế, ức chế, hủy bỏ hoặc cản trở quá trình tải nạp tín hiệu do sự tương tác của PD-L2 với một hoặc nhiều đối tác trong số các đối tác liên kết của nó, như PD-1. Theo một phương án, chất đối kháng liên kết PD-L2 làm giảm tín hiệu đồng kích thích âm tính được điều tiết bởi hoặc thông qua các protein bề mặt tế bào được biểu hiện trên bạch huyết bào T được điều tiết việc truyền tín hiệu thông qua PD-L2

để làm cho tế bào T loạn chức năng trở nên ít loạn chức năng hơn (ví dụ, tăng cường các đáp ứng tác động đối với quá trình nhận biết kháng nguyên). Theo một số phương án, chất đối kháng liên kết PD-L2 là chất kết dính miễn dịch.

Thuật ngữ "protein", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ protein nguyên thể bất kỳ từ nguồn động vật có xương sống bất kỳ, bao gồm các động vật có vú như các động vật linh trưởng (ví dụ, con người) và các động vật gặm nhấm (ví dụ, chuột nhắt và chuột cống), trừ khi có quy định khác. Thuật ngữ này bao gồm cả protein chưa được xử lý có "chiều dài đầy đủ" cũng như dạng bất kỳ của protein là kết quả của quá trình xử lý ở tế bào. Thuật ngữ này cũng bao gồm các biến thể có trong tự nhiên của protein này, ví dụ, các biến thể ghép mã hoặc các biến thể alen.

"Độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo phần trăm (%)" so với trình tự polypeptit tham chiếu được định nghĩa là tỷ lệ phần trăm của các gốc axit amin trong trình tự ứng viên mà đồng nhất với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi xếp thẳng hàng các trình tự này và đưa các khoảng trống vào, nếu cần, để đạt được độ đồng nhất trình tự tối đa tính theo phần trăm, và không coi dạng thay thế bảo toàn bất kỳ là một phần của độ đồng nhất trình tự. Có thể thực hiện được việc xếp thẳng hàng nhằm mục đích xác định độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo phần trăm theo các cách khác nhau thuộc phạm vi kỹ năng trong lĩnh vực kỹ thuật này, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm vi tính bán công khai như BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc phần mềm Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này có thể xác định các thông số thích hợp để xếp thẳng hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được mức xếp thẳng hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài đầy đủ của các trình tự được đem so sánh. Tuy nhiên, vì các mục đích trong bản mô tả này, các trị số về độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % được tạo ra bằng cách sử dụng chương trình vi tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình vi tính so sánh trình tự ALIGN-2 này được viết bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp với hồ sơ người sử dụng tại Cục Bản quyền Mỹ, Thủ đô Washington, 20559, mà tại đó nó được đăng ký theo Giấy Đăng ký Bản quyền Mỹ số TXU510087. Chương trình ALIGN-2 được Genentech, Inc., South San Francisco,

California bán công khai, hoặc có thể được dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 cần phải được dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm cả UNIX V4.0D kỹ thuật số. Tất cả các thông số so sánh trình tự được ấn định bằng chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

Trong các tình huống trong đó ALIGN-2 được sử dụng để so sánh trình tự axit amin, thì độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % của trình tự axit amin A đã cho so với, với hoặc đối với trình tự axit amin B đã cho (câu này có thể được diễn đạt theo cách khác là trình tự axit amin A đã cho mà có hoặc bao gồm độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % nhất định so với, với hoặc đối với trình tự axit amin B đã cho) được tính như sau:

100 nhân với phân số X/Y

trong đó X là số gốc axit amin được tính điểm là các cặp so khớp đồng nhất bằng chương trình xếp thẳng hàng trình tự ALIGN-2 trong dạng xếp thẳng hàng A và B của chương trình đó, và trong đó Y là tổng số các gốc axit amin ở B. Sẽ hiểu được rằng trường hợp độ dài của trình tự axit amin A không bằng độ dài của trình tự axit amin B, thì độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % của A với B sẽ không bằng độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % của B với A. Trừ khi được quy định cụ thể khác đi, tất cả các trị số về độ đồng nhất trình tự axit amin tính theo % được sử dụng trong bản mô tả này là thu được như được mô tả trong đoạn văn ngay trên đây bằng cách sử dụng chương trình vi tính ALIGN-2.

Thuật ngữ " dược phẩm" được dùng để chỉ chế phẩm ở dạng mà cho phép hoạt tính sinh học của thành phần hoạt tính được chứa trong đó trở nên hữu hiệu, và chế phẩm này không chứa các hợp phần phụ thêm mà độc hại đến mức không thể chấp nhận được đối với đối tượng được cho dùng dạng chế phẩm này.

"Chất mang dược dụng" được dùng để chỉ thành phần trong dược phẩm, không phải là thành phần hoạt tính, thành phần này không độc hại đối với đối tượng. Chất mang dược dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, dung dịch đệm, tá dược, chất làm ổn định, hoặc chất bảo quản.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "sự điều trị" (và các dạng thay đổi về ngữ pháp của nó như "điều trị" hoặc "việc điều trị") được dùng để chỉ sự can thiệp lâm sàng nhằm cố gắng thay đổi tiến trình tự nhiên của cá thể đang được điều trị, và có thể được thực hiện để phòng bệnh hoặc trong tiến trình bệnh lý lâm sàng. Các tác dụng điều trị mong muốn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, ngăn chặn sự xuất hiện hoặc tái phát bệnh, giảm bớt các triệu chứng, giảm nhẹ các hậu quả bệnh lý trực tiếp hoặc gián tiếp bất kỳ của bệnh, ngăn ngừa di căn, làm giảm tốc độ tiến triển của bệnh, cải thiện hoặc làm dịu tình trạng bệnh, và thuyên giảm hoặc cải thiện chẩn đoán. Theo một số phương án, các kháng thể theo sáng chế được sử dụng để trì hoãn sự phát triển của bệnh hoặc để làm chậm sự tiến triển của bệnh.

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "việc trì hoãn sự tiến triển" của rối loạn hoặc bệnh có nghĩa là hoãn, gây trở ngại, làm chậm, trì hoãn, làm ổn định, và/hoặc hoãn lại sự phát triển của bệnh hoặc rối loạn (ví dụ, rối loạn tăng sinh tế bào, ví dụ, bệnh ung thư). Sự trì hoãn này có thể kéo dài trong các khoảng thời gian khác nhau, tùy thuộc vào tiền sử của bệnh và/hoặc cá thể đang được điều trị. Như người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực kỹ thuật này hiểu rõ, trên thực tế, sự trì hoãn đủ hoặc đáng kể có thể bao gồm cả sự phòng ngừa, trong đó cá thể không phát triển bệnh. Ví dụ, bệnh ung thư giai đoạn muộn, như đã phát triển di căn, có thể được trì hoãn.

Thuật ngữ "epitop" được dùng để chỉ vị trí cụ thể trên phân tử kháng nguyên mà kháng thể này liên kết vào đó. Theo một số phương án, vị trí cụ thể trên phân tử kháng nguyên mà kháng thể liên kết vào đó được xác định bằng việc xác định không gian chiếm chỗ của gốc hydroxyl (ví dụ, miền liên kết FcRH5). Theo một số phương án, vị trí cụ thể trên phân tử kháng nguyên mà kháng thể liên kết vào đó được xác định bằng tinh thể học.

Nói là "làm giảm" hoặc "ức chế" nghĩa là khả năng gây ra sự giảm tổng thể, ví dụ, là từ 20% trở lên, từ 50% trở lên, hoặc từ 75%, 85%, 90%, 95%, trở lên. Theo các phương án nhất định, làm giảm hoặc ức chế có thể dùng để chỉ chức năng tác động của kháng thể mà do vùng Fc của kháng thể điều tiết, các chức năng tác động như vậy cụ thể bao gồm độc tính tế bào phụ thuộc vào bổ thể (complement-dependent

cytotoxicity-CDC), độc tính tế bào phụ thuộc vào kháng thể (antibody-dependent cellular cytotoxicity-ADCC), và thực bào phụ thuộc vào kháng thể (antibody-dependent cellular phagocytosis-ADCP).

Thuật ngữ "vùng biến đổi" hoặc "miền biến đổi" được dùng để chỉ miền của chuỗi nặng hoặc chuỗi nhẹ của kháng thể mà liên quan đến việc liên kết kháng thể vào kháng nguyên. Các miền biến đổi của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ (lần lượt là VH và VL) của kháng thể nguyên thể thường có các cấu trúc tương tự nhau, trong đó mỗi miền bao gồm bốn vùng khung (FR) được bảo toàn và ba vùng siêu biến (HVR). (ví dụ, xem tài liệu: Kindt et al. *Kuby Immunology*, 6th ed., W.H. Freeman and Co., trang 91 (2007)). Một miền VH hoặc VL đơn lẻ có thể là đủ để đem lại tính đặc hiệu liên kết kháng nguyên. Ngoài ra, các kháng thể mà liên kết với một kháng nguyên cụ thể có thể được phân lập bằng cách sử dụng miền VH hoặc VL từ kháng thể liên kết kháng nguyên đó để lần lượt sàng lọc thư viện của các miền VL hoặc VH bổ trợ. Ví dụ, xem tài liệu: Portolano et al., *J. Immunol.* 150:880-887 1993; Clarkson et al., *Nature* 352:624-628, 1991.

"Biến thể vùng Fc" bao gồm trình tự axit amin khác với trình tự axit amin của vùng Fc trình tự nguyên thể do ít nhất một cải biến axit amin, tốt hơn nếu là một hoặc nhiều (các) cải biến dạng thay thế axit amin. Tốt hơn nếu biến thể vùng Fc có ít nhất một cải biến dạng thay thế axit amin so với vùng Fc trình tự nguyên thể hoặc so với vùng Fc của polypeptit ban đầu, ví dụ, khoảng từ một đến mười cải biến dạng thay thế axit amin, và tốt hơn, nếu khoảng từ một đến năm cải biến dạng thay thế axit amin trong vùng Fc trình tự nguyên thể hoặc trong vùng Fc của polypeptit ban đầu. Tốt hơn nếu biến thể vùng Fc trong bản mô tả này sở hữu độ tương đồng ít nhất là khoảng 80% với vùng Fc trình tự nguyên thể và/hoặc với vùng Fc của polypeptit ban đầu, và tốt hơn cả nếu có độ tương đồng ít nhất là khoảng 90% với chúng, càng tốt hơn nếu có độ tương đồng ít nhất là khoảng 95% với chúng.

Thuật ngữ "vật truyền", như được sử dụng trong bản mô tả này, được dùng để chỉ phân tử axit nucleic có khả năng nhân rộng một axit nucleic khác mà nó được liên kết vào đó. Thuật ngữ này bao gồm vật truyền trong vai trò là cấu trúc axit nucleic tự sao chép cũng như vật truyền được sát nhập vào hệ gen của tế bào chủ mà nó đã được

đưa vào đó. Các vật truyền nhất định có khả năng định hướng sự biểu hiện của các axit nucleic mà chúng được liên kết điều khiển được vào đó. Các vật truyền như vậy trong bản mô tả này được gọi là "vật truyền biểu hiện".

Như được sử dụng trong bản mô tả này, "cho dùng" có nghĩa là phương pháp cho đối tượng dùng liều lượng của hợp chất (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế hoặc axit nucleic mã hóa kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế) hoặc chế phẩm (ví dụ, dược phẩm, ví dụ, dược phẩm bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế). Các chế phẩm được sử dụng trong các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này có thể được cho dùng, ví dụ, trong cơ, trong tĩnh mạch, trong da, qua da, trong động mạch, trong màng bụng, trong thương tổn, trong sọ, trong khớp, trong tuyến tiền liệt, trong màng phổi, trong khí quản, trong mũi, trong dịch kính, qua đường trong âm đạo, trong trực tràng, khu trú, trong khối u, qua màng bụng, dưới da, dưới kết mạc, trong bàng quang, qua màng nhầy, trong màng bao tim, trong rốn, trong mắt, qua đường miệng, khu trú, cục bộ, bằng phương pháp xông hít, bằng cách tiêm, bằng cách truyền, bằng cách truyền liên tục, bằng cách tưới ngập cục bộ các tế bào đích một cách trực tiếp, bằng ống thông, bằng cách rửa, trong kem, hoặc trong các chế phẩm lipit. Phương pháp cho dùng này có thể thay đổi tùy thuộc vào các yếu tố khác nhau (ví dụ, hợp chất hoặc chế phẩm đang được cho dùng và mức độ trầm trọng của tình trạng bệnh, bệnh, hoặc rối loạn đang được điều trị).

II. Các chế phẩm và các phương pháp

Theo một khía cạnh, sáng chế này dựa một phần vào các kháng thể kháng FcRH5. Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng FcRH5 là đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) và liên kết, ngoài FcRH5 hoặc mảnh của nó ra, phân tử sinh học thứ hai (ví dụ, kháng nguyên bề mặt tế bào, ví dụ, dấu ấn tế bào T, ví dụ, CD3 (ví dụ, CD3ε và/hoặc CD3γ)). Các kháng thể theo sáng chế là hữu ích, ví dụ, đối với việc chẩn đoán và/hoặc điều trị hoặc trì hoãn sự tiến triển của rối loạn tăng sinh tế bào (ví dụ, bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, đa u tủy) ở đối tượng.

A. Các kháng thể kháng FcRH5 làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 2; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 3; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 4; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 5; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 6.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 104 và/hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 105. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit

amin là SEQ ID NO: 105. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v85, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 106 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 107. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 53, 54, 46 và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 106. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 107. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v93, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 106 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 107.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 82 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 83. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 82 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 83.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao

gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 21. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 84 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 85. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 84. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 85. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1.1, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 84 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 85.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 17; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 86 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%,

91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 87. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 86. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 87. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1.2, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 86 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 87.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR) (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 13; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 21. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 88 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 89. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin là các SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 88. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ,

1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 89. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1.3, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 88 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 89.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền liên kết bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 90 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 91. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 90. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 91. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1.4, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến

kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 90 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 91.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 22. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 92 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 93. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 92. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50 và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 93. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1.5, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 92 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 93.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 19; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 24. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 94 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 95. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự axit amin là các SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 94. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 95. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1,6, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 94 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 95.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao

gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 25. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 96 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 97. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 53, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 96. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 97. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1.7, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 96 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 97.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 25. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 98, và/hoặc

miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 99. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 52, 55, 46 và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 98. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 99. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1.13, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 có thể bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 98 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 99.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 18; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 25. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 100 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 101. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao

gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo một điểm bất kỳ trong số các điểm từ 79 đến 82, trong đó kháng thể này còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 57, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 101. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1.13.1, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 100 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 101.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 102 và/hoặc (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 103. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ

FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v87, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 102 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 103.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 32; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 33; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 34; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 35; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 36; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 37. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 110 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 111. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 66, 67, 68, và 69. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 95, trong đó miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 110. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 70, 71, 72, và 73. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 111. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 17B1, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5

bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 110 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 111.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 38; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 39; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 40; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 41; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 42; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 43. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 112 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 113. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 74, 75, 76, và 77. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 112. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 78, 79, 80, và 81. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 113. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 15G8, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 112 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 113.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR)

được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 26; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 27; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 28; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 29; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 30; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 31. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 108 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 109. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 58, 59, 60, và 61. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 108. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 62, 63, 64, và 65. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 109. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 7D8, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 108 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 109.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng

FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 185 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 186. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 179, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 185. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 186. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1A, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 185 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 186.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 187 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 188. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 180, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 187. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 188. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1B, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 187 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 188.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 189 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 190. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 181, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình

tự axit amin là SEQ ID NO: 189. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 190. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1C, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 189 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 190.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 191 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 192. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 23, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 191. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 192. Trong một trường hợp cụ thể, kháng

thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1D, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 191 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 192.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 193 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 194. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 182, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 193. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 194. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1E, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 193 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 194.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 175; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 195 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 196. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 195. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 196. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1F, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 195 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 196.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 176; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO:

11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 197 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 198. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 197. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 198. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1G, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 197 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 198.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 177; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc

trình tự là, SEQ ID NO: 199 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 200. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 199. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 200. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1H, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 199 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 200.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 178; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 201 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 202. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1,

FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 201. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 202. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1I, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 201 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 202.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 203 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 204. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 183, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 203. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48,

56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 204. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1J, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 203 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 204.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 205 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 206. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 184, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 205. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 206. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1K, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng

FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 205 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 206.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 7; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 11; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 15; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 20. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 207 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 208. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 207. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 208. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v1L, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 207 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 208.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR)

được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 209 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 210. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 209. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 210. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v86, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 209 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 210.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng

FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 211 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 212. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 53, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 211. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 212. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v191, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 211 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 212.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 10; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 14; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 theo yêu cầu bảo hộ có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 213 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%,

89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 214. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 bao gồm các trình tự là SEQ ID NO: 52, 54, 46, và 47. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 213. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 48, 56, 50, và 51. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có thể có miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 214. Trong một trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 có thể là 1G7.v92, hoặc dẫn xuất hoặc đối tượng liên quan về mặt vô tính của nó. Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 có miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 213 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 214.

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề cập đến trong bản mô tả này là kháng thể đơn dòng, kháng thể của người, kháng thể được biến đổi giống như của người, hoặc kháng thể thể khảm. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 này là kháng thể IgG. Kháng thể kháng FcRH5 có thể là kháng thể có chiều dài đầy đủ và/hoặc kháng thể đơn đặc hiệu. Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng FcRH5 có thể liên kết vào epitop trong miền giống Ig 9 của FcRH5. Ví dụ, epitop này có thể bao gồm một phần của các axit amin 743-850 của SEQ ID NO: 114. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của người hoặc FcRH5 của khỉ đuôi dài (cyno), hoặc cả hai. Trong các trường hợp khác, miền liên kết này không liên kết đặc hiệu vào FcRH1, FcRH2, FcRH3, và/hoặc FcRH4.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 10ml/kg/ngày đến 45ml/kg/ngày (ví dụ, khoảng 1ml/kg/ngày, 5ml/kg/ngày, 10ml/kg/ngày, 11ml/kg/ngày, 12ml/kg/ngày, 13ml/kg/ngày, 14ml/kg/ngày, 15ml/kg/ngày, 16ml/kg/ngày, 17ml/kg/ngày, 18ml/kg/ngày, 19ml/kg/ngày, 20ml/kg/ngày, 21ml/kg/ngày, 22ml/kg/ngày,

23ml/kg/ngày, 24ml/kg/ngày, 25ml/kg/ngày, 26ml/kg/ngày, 27ml/kg/ngày, 28ml/kg/ngày, 29ml/kg/ngày, 30ml/kg/ngày, 31ml/kg/ngày, 32ml/kg/ngày, 33ml/kg/ngày, 34ml/kg/ngày, 35ml/kg/ngày, 36ml/kg/ngày, 37ml/kg/ngày, 38ml/kg/ngày, 39ml/kg/ngày, 40ml/kg/ngày, 41ml/kg/ngày, 42ml/kg/ngày, 43ml/kg/ngày, hoặc 44ml/kg/ngày).

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 1ml/kg/ngày đến 5ml/kg/ngày, khoảng từ 6ml/kg/ngày đến 10ml/kg/ngày, khoảng từ 11ml/kg/ngày đến 15ml/kg/ngày, khoảng từ 16ml/kg/ngày đến 20ml/kg/ngày, khoảng từ 21ml/kg/ngày đến 25ml/kg/ngày, khoảng từ 26ml/kg/ngày đến 30ml/kg/ngày, khoảng từ 31ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày, khoảng từ 36ml/kg/ngày đến 40ml/kg/ngày, khoảng từ 41ml/kg/ngày đến 45ml/kg/ngày ở chuột nhắt. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 10ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày ở chuột nhắt. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 10ml/kg/ngày đến 20ml/kg/ngày ở chuột nhắt. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 12ml/kg/ngày đến 16ml/kg/ngày ở chuột nhắt.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 1ml/kg/ngày đến 5ml/kg/ngày, khoảng từ 6ml/kg/ngày đến 10ml/kg/ngày, khoảng từ 11ml/kg/ngày đến 15ml/kg/ngày, khoảng từ 16ml/kg/ngày đến 20ml/kg/ngày, khoảng từ 21ml/kg/ngày đến 25ml/kg/ngày, khoảng từ 26ml/kg/ngày đến 30ml/kg/ngày, khoảng từ 31ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày, khoảng từ 36ml/kg/ngày đến 40ml/kg/ngày, khoảng từ 41ml/kg/ngày đến 45ml/kg/ngày ở khỉ cyno. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 20ml/kg/ngày đến 40ml/kg/ngày ở khỉ cyno. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 25ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày ở khỉ cyno. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 có mức

thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 30ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày ở khỉ cyno.

Theo một khía cạnh khác nữa, kháng thể kháng FcRH5 theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây có thể kết hợp đặc tính bất kỳ trong số các đặc tính này, một cách đơn lẻ hoặc kết hợp, như được mô tả ở các Mục 1-7 dưới đây.

1. Ái lực kháng thể

Trong các trường hợp cụ thể, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của người và/hoặc FcRH5 của khỉ cyno với hằng số phân ly (K_D) ≤ 1μM, ≤ 100nM, ≤ 10nM, ≤ 1nM, ≤ 0,1nM, ≤ 0,01nM, hoặc ≤ 0,001nM (ví dụ, 10^{-8} M hoặc thấp hơn, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-10} đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-11} đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-12} đến 10^{-13} M). Ví dụ, trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của người với K_D ≤100nM (ví dụ, ≤ 90nM, ≤80nM, ≤ 70nM, ≤60nM, ≤50nM, ≤40nM, ≤30nM, ≤20nM, ≤10nM, ≤5nM, ≤ 1nM, ≤ 750pM, ≤500pM, ≤250pM, ≤100pM, ≤50pM, ≤25pM, ≤10pM, ≤5pM, hoặc ≤ 1pM) hoặc thấp hơn.

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 1pM đến 500nM (ví dụ, khoảng từ 1pM đến 200pM, từ 100pM đến 300pM, từ 200pM đến 400pM, từ 300pM đến 500pM, từ 400pM đến 600pM, từ 500pM đến 700pM, từ 600pM đến 800pM, từ 700pM đến 900pM, từ 800pM đến 1nM, từ 900pM đến 100nM, từ 1nM đến 200nM, từ 100nM đến 300nM, từ 200nM đến 400nM, hoặc từ 300nM đến 500nM). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 1pM đến 1nM (ví dụ, khoảng từ 1pM đến 100pM, từ 50pM đến 150pM, từ 100pM đến 200pM, từ 150pM đến 250pM, từ 200pM đến 300pM, từ 250pM đến 350pM, từ 300pM đến 400pM, từ 350pM đến 450pM, từ 400pM đến 500pM, từ 450pM đến 550pM, từ 500pM đến 600pM, từ 550pM đến 650pM, từ 600pM đến 700pM, từ 650pM đến 750pM, từ 700pM đến 800pM, từ 750pM đến 850pM, từ 800pM đến 900pM, từ 850pM đến 950pM, hoặc từ 900pM đến 1nM). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 100pM đến 500pM (ví dụ, khoảng 100pM, 125pM, 150pM, 175pM, 200pM, 225pM,

250pM, 275pM, 300pM, 325pM, 350pM, 375pM, 400pM, 425pM, 450pM, 475pM, hoặc 500pM). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 100pM đến 160pM (ví dụ, khoảng 100pM, 105pM, 110pM, 115pM, 120pM, 125pM, 130pM, 135pM, 140pM, 145pM, 150pM, 155pM, hoặc 160pM). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của người với K_D nằm trong khoảng từ 1nM đến 150nM (ví dụ, khoảng 1nM, 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 6nM, 7nM, 8nM, 9nM, 10nM, 11nM, 12 nM, 13nM, 14nM, 15nM, 16nM, 17nM, 18nM, 19nM, 20nM, 21nM, 22nM, 23nM, 24nM, 25nM, 26nM, 27nM, 28nM, 29nM, 30nM, 31nM, 32nM, 33nM, 34nM, 35nM, 36nM, 37nM, 38nM, 39nM, 40nM, 41nM, 42nM, 43nM, 44nM, 45nM, 46nM, 47nM, 48nM, 49nM, 50nM, 55nM, 60nM, 65nM, 70nM, 75nM, 80nM, 85nM, 90nM, 95nM, 100nM, 105nM, 110nM, 115nM, 120nM, 125nM, 130nM, 135nM, 140nM, 145nM, hoặc 150nM).

Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno với K_D ≤100nM (ví dụ, ≤ 90nM, ≤80nM, ≤ 70nM, ≤60nM, ≤50nM, ≤40nM, ≤30nM, ≤20nM, ≤10nM, ≤5nM, ≤ 1nM, ≤ 750pM, ≤500pM, ≤250pM, ≤100pM, ≤50pM, ≤25pM, ≤10pM, ≤5pM, hoặc ≤ 1pM, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-10} đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-11} đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-12} đến 10^{-13} M) hoặc thấp hơn. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno với K_D nằm trong khoảng từ 1pM đến 500nM (ví dụ, khoảng từ 1pM đến 200pM, từ 100pM đến 300pM, từ 200pM đến 400pM, từ 300pM đến 500pM, từ 400pM đến 600pM, từ 500pM đến 700pM, từ 600pM đến 800pM, từ 700pM đến 900pM, từ 800pM đến 1nM, từ 900pM đến 100nM, từ 1nM đến 200nM, từ 100nM đến 300nM, từ 200nM đến 400nM, hoặc từ 300nM đến 500nM). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno với K_D nằm trong khoảng từ 1pM đến 1nM (ví dụ, khoảng từ 1pM đến 100pM, từ 50pM đến 150pM, từ 100pM đến 200pM, từ 150pM đến 250pM, từ 200pM đến 300pM, từ 250pM đến 350pM, từ 300pM đến 400pM, từ 350pM đến 450pM, từ 400pM đến 500pM, từ 450pM đến 550pM, từ 500pM đến 600pM, từ 550pM đến 650pM, từ 600pM đến 700pM, từ 650pM đến 750pM, từ 700pM đến 800pM, từ 750pM đến 850pM, từ 800pM đến 900pM, từ 850pM đến 950pM, hoặc

từ 900pM đến 1nM). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno với K_D nằm trong khoảng từ 100pM đến 500pM (ví dụ, khoảng 100pM, 125pM, 150pM, 175pM, 200pM, 225pM, 250pM, 275pM, 300pM, 325pM, 350pM, 375pM, 400pM, 425pM, 450pM, 475pM, hoặc 500pM). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno với K_D nằm trong khoảng từ 100pM đến 160pM (ví dụ, khoảng 100pM, 105pM, 110pM, 115pM, 120pM, 125pM, 130pM, 135pM, 140pM, 145pM, 150pM, 155pM, hoặc 160pM). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno với K_D nằm trong khoảng từ 1nM đến 150nM (ví dụ, khoảng 1nM, 2nM, 3nM, 4nM, 5nM, 6nM, 7nM, 8nM, 9nM, 10nM, 11nM, 12 nM, 13nM, 14nM, 15nM, 16nM, 17nM, 18nM, 19nM, 20nM, 21nM, 22nM, 23nM, 24nM, 25nM, 26nM, 27nM, 28nM, 29nM, 30nM, 31nM, 32nM, 33nM, 34nM, 35nM, 36nM, 37nM, 38nM, 39nM, 40nM, 41nM, 42nM, 43nM, 44nM, 45nM, 46nM, 47nM, 48nM, 49nM, 50nM, 55nM, 60nM, 65nM, 70nM, 75nM, 80nM, 85nM, 90nM, 95nM, 100nM, 105nM, 110nM, 115nM, 120nM, 125nM, 130nM, 135nM, 140nM, 145nM, hoặc 150nM).

Theo một phương án, K_D được đo bằng thử nghiệm liên kết kháng nguyên được đánh dấu phóng xạ (radiolabeled antigen binding assay-RIA). Theo một phương án, RIA được thực hiện với phiên bản Fab của kháng thể đang được quan tâm và kháng nguyên của nó. Ví dụ, ái lực liên kết dung dịch của Fab đối với kháng nguyên được đo bằng cách làm cân bằng Fab với nồng độ tối thiểu của kháng nguyên đã được đánh dấu bằng (^{125}I) với sự có mặt của dãy chuẩn độ của kháng nguyên không được đánh dấu, sau đó, bắt kháng nguyên đã được liên kết bằng đĩa được phủ kháng thể kháng Fab (ví dụ, xem tài liệu: Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881, 1999). Để thiết lập các điều kiện cho thử nghiệm này, đĩa đa lỗ MICROTITER® (Thermo Scientific) được phủ qua đêm bằng 5µg/ml kháng thể kháng Fab bắt (Cappel Labs) trong natri carbonat 50mM (độ pH = 9,6), và sau đó được phong bế bằng albumin huyết thanh bò 2% (trọng lượng/thể tích) trong PBS trong từ hai đến năm giờ ở nhiệt độ trong phòng (xấp xỉ 23°C). Trong đĩa không hấp phụ (số Nunc 269620), kháng nguyên - [^{125}I] 100pM hoặc 26pM được trộn với các dung dịch pha loãng theo dãy của Fab đang được quan tâm (ví dụ, nhất quán với sự đánh giá về kháng thể kháng VEGF,

Fab-12, trong tài liệu: Presta et al., *Cancer Res.* 57:4593-4599, 1997). Sau đó, Fab đang được quan tâm được ủ qua đêm; tuy nhiên, việc ủ có thể tiếp tục trong khoảng thời gian lâu hơn (ví dụ, khoảng 65 giờ) để đảm bảo đạt đến được độ cân bằng. Sau đó, các hỗn hợp được chuyển sang đĩa bắt dùng để ủ ở nhiệt độ trong phòng (ví dụ, trong một giờ). Sau đó, dung dịch này được loại ra và đĩa được rửa tám lần bằng polysorbat 20 0,1% (TWEEN-20®) trong PBS. Khi các đĩa đã khô, 150µl/lỗ chất nhấp nháy (MICROSCINT-20 ™; Packard) được bổ sung vào, và các đĩa được đếm trên thiết bị đếm gamma TOPCOUNT ™ (Packard) trong mười phút. Nồng độ của mỗi Fab mà đem lại mức liên kết ít hơn hoặc bằng 20% mức liên kết tối đa được chọn để sử dụng trong các thử nghiệm liên kết cạnh tranh.

Theo một phương án khác, K_D được đo bằng cách sử dụng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt BIACORE®. Ví dụ, một thử nghiệm có sử dụng BIACORE®-2000 hoặc BIACORE ®-3000 (BIAcore, Inc., Piscataway, NJ) được thực hiện ở 25°C bằng kháng nguyên đã được làm bất động trên chip CM5 ở mức ~10 đơn vị đáp ứng (response unit-RU). Theo một phương án, chip cảm biến sinh học dextran đã được carboxymetyl hóa (CM5, BIACORE, Inc.) được hoạt hóa bằng *N*-etyl-*N'*-(3-dimetylaminopropyl)-carbodiimit hydroclorua (EDC) và *N*-hydroxysuxinimit (NHS) theo các hướng dẫn của nhà cung cấp. Kháng nguyên được pha loãng bằng natri axetat 10mM, độ pH = 4,8, đến 5µg/ml (~0,2µM) trước khi tiêm ở tốc độ dòng chảy là 5µl/phút để đạt được xấp xỉ 10 đơn vị đáp ứng (response unit-RU) của protein được liên hợp. Sau khi tiêm kháng nguyên, etanolamin 1M được tiêm để phong bế các nhóm chưa phản ứng. Đối với các phép đo động học, các dung dịch pha loãng hai lần theo dãy của Fab (0,78nM đến 500nM) được tiêm trong PBS với chất hoạt động bề mặt polysorbat 20 0,05% (TWEEN-20™) (PBST) ở 25°C ở tốc độ dòng chảy là xấp xỉ 25µl/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 một-một đơn giản (BIACORE ® Evaluation Software phiên bản 3.2) bằng cách vẽ theo điểm một cách đồng thời các biểu đồ cảm biến kết hợp và phân ly. Hằng số phân ly cân bằng (K_D) được tính toán ở dạng tỷ lệ k_{on}/k_{off}. Ví dụ, xem tài liệu: Chen et al., *J. Mol. Biol.* 293:865-881, 1999. Nếu tốc độ kết hợp vượt quá $10^6 M^{-1}s^{-1}$ bằng thử nghiệm cộng hưởng plasmon bề mặt trên đây, thì tốc độ kết hợp này có thể được xác định bằng cách sử dụng kỹ thuật dập tắt huỳnh

quang đo mức tăng hoặc giảm cường độ phát huỳnh quang (kích thích = 295nm; phát xạ = 340nm, 16nm thông dải) ở 25°C của kháng thể kháng kháng nguyên 20nM (dạng Fab) trong PBS, độ pH = 7,2, với sự có mặt của các nồng độ tăng dần của kháng nguyên như được đo trong phổ kế, như quang phổ kế được trang bị bộ phận ngừng dòng chảy (Aviv instruments) hoặc quang phổ kế 8000-series SLM-AMINCO ™ (ThermoSpectronic) với chậu thủy tinh có thiết bị khuấy.

2. Các mảnh kháng thể

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề cập đến trong bản mô tả này là mảnh kháng thể. Các mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các mảnh bis-Fab, Fab, Fab', Fab'-SH, $F(ab')_2$, Fv, và mảnh scFv, và các mảnh khác được mô tả dưới đây. Để tìm hiểu về một số mảnh kháng thể nhất định, xem tài liệu: Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134, 2003. Để tìm hiểu về mảnh scFv, ví dụ, xem tài liệu: Pluckthün, trong *Pharmacology of Monoclonal Antibodies*, vol. 113, Rosenburg and Moore eds., (Springer-Verlag, New York), pp. 269-315, 1994; xem thêm tài liệu: WO 93/16185; và các Patent Mỹ số 5571894 và 5587458. Về phần bàn luận về các mảnh Fab và $F(ab')_2$ bao gồm các gốc epitop liên kết thụ thể cứu trợ và có thời gian bán hủy *in vivo* tăng, xem Patent Mỹ số 5869046.

Các mảnh kháng thể mà trong đó hai Fab được liên kết thông qua bis-maleimit trong bản mô tả này được gọi là bismaleimit-$(thio\text{-}Fab)_2$ hoặc bis-Fab.

Các kháng thể thể đôi là các mảnh kháng thể có hai vị trí liên kết kháng nguyên mà có thể có hóa trị hai hoặc đặc hiệu kép. Ví dụ, xem tài liệu: EP 404097; WO 1993/01161; Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134, 2003; và Hollinger et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 90:6444-6448, 1993. Các kháng thể thể ba và các kháng thể thể bốn cũng được mô tả trong tài liệu: Hudson et al. *Nat. Med.* 9:129-134, 2003.

Các kháng thể miền đơn là các mảnh kháng thể bao gồm tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nặng hoặc tất cả hoặc một phần của miền biến đổi chuỗi nhẹ của kháng thể. Theo các phương án nhất định, kháng thể miền đơn là kháng thể miền đơn của người (Domantis, Inc., Waltham, MA; ví dụ, xem tài liệu: Patent Mỹ số 6248516 B1).

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

3. Kháng thể thể khảm và kháng thể được biến đổi giống như của người

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề cập đến trong bản mô tả này là kháng thể thể khảm. Một số kháng thể thể khảm nhất định được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Patent Mỹ số 4816567; và Morrison et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 81:6851-6855, 1984. Theo một ví dụ, kháng thể thể khảm bao gồm vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi có nguồn gốc từ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải người, như khỉ) và vùng hằng định của người. Theo một ví dụ khác nữa, kháng thể thể khảm là kháng thể "chuyển lớp" trong đó lớp hoặc phân lớp này đã được thay đổi so với lớp hoặc phân lớp của kháng thể ban đầu. Các kháng thể thể khảm bao gồm các mảnh liên kết kháng nguyên của chúng.

Theo các phương án nhất định, kháng thể thể khảm là kháng thể được biến đổi giống như của người. Thông thường, kháng thể không phải của người được biến đổi giống như của người để làm giảm tính sinh miễn dịch đối với con người, trong khi giữ lại tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể ban đầu không phải của người. Nhìn chung, kháng thể được biến đổi giống như của người bao gồm một hoặc nhiều miền biến đổi mà trong đó các HVR, ví dụ, các CDR, (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc các phần của chúng) có nguồn gốc từ các trình tự kháng thể của người. Kháng thể được biến đổi giống như của người tùy ý cũng bao gồm ít nhất một phần của vùng hằng định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR ở kháng thể được biến đổi giống như của người được thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà từ đó các gốc HVR được tạo ra), ví dụ, để phục hồi hoặc cải thiện ái lực hoặc tính đặc hiệu kháng thể.

Các kháng thể được biến đổi giống như của người và các phương pháp tạo ra chúng được tìm hiểu, ví dụ, trong tài liệu: Almagro et al. *Front. Biosci.* 13:1619-

1633, 2008, và được mô tả thêm, ví dụ, trong tài liệu: Riechmann et al. *Nature* 332:323-329, 1988; Queen et al. *Proc. Natl Acad. Sci. USA* 86:10029-10033, 1989; các Patent Mỹ số 5821337, 7527791, 6982321, và 7087409; Kashmiri *et al. Methods* 36:25-34, 2005 (mô tả việc ghép vùng quyết định tính đặc hiệu (specificity determining region-SDR)); Padlan *Mol. Immunol.* 28:489-498, 1991 (mô tả "việc tạo lại bề mặt"); Dall'Acqua et al. *Methods* 36:43-60, 2005 (mô tả "việc xáo trộn FR"); và Osbourn et al. *Methods* 36:61-68, 2005; và Klimka et al. *Br. J. Cancer*, 83:252-260, 2000 (mô tả phương pháp "chọn lọc có hướng dẫn" đối với việc xáo trộn FR).

Các vùng khung của người mà có thể được sử dụng cho phương pháp biến đổi giống như của người bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: các vùng khung được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp "khớp nhất" (ví dụ, xem tài liệu: Sims et al.*J. Immunol.* 151:2296, 1993); các vùng khung được tạo ra từ trình tự liên ứng của các kháng thể của người thuộc một phân lớp cụ thể của vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc vùng biến đổi chuỗi nặng (ví dụ, xem tài liệu: Carter et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 89:4285, 1992; và Presta et al. *J. Immunol.*, 151:2623, 1993); các vùng khung trưởng thành (bị đột biến tế bào cơ thể) của người hoặc các vùng khung dòng mầm của người (ví dụ, xem tài liệu: Almagro et al, *Front.Biosci.* 13:1619-1633, 2008); và các vùng khung được tạo ra từ thư viện FR sàng lọc (ví dụ, xem tài liệu: Baca et al., *J. Biol. Chem.* 272:10678-10684, 1997 và Rosok et al., *J. Biol. Chem.* 271:22611-22618, 1996).

4. Các kháng thể của người

Theo các phương án nhất định, kháng thể được đề cập đến trong bản mô tả này là kháng thể của người. Các kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các kỹ thuật khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này. Các kháng thể của người được mô tả tổng quát trong tài liệu: van Dijk and van de Winkel, *Curr. Opin. Pharmacol.* 5: 368-74, 2001 và Lonberg, *Curr. Opin. Immunol.* 20:450-459, 2008.

Các kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách cho con vật chuyển gen đã biến đổi dùng chất sinh miễn dịch để tạo ra các kháng thể nguyên vẹn của người hoặc các kháng thể nguyên vẹn có các vùng biến đổi của người đáp ứng lại thử thách

kháng nguyên. Các con này thường chứa tất cả hoặc một phần locus globulin miễn dịch của người mà thay thế locus globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt ngoài nhiễm sắc thể hoặc được kết hợp một cách ngẫu nhiên vào các nhiễm sắc thể của động vật. Ở chuột nhắt chuyển gen như vậy, locus globulin miễn dịch nội sinh thường được làm bất hoạt. Để tìm hiểu về các phương pháp nhằm thu được các kháng thể của người từ các con vật chuyển gen, xem tài liệu: Lonberg, *Nat. Biotech.* 23:1117-1125, 2005. Ví dụ, xem thêm: các Patent Mỹ số 6075181 và 6150584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; Patent Mỹ số 5770429 mô tả công nghệ HUMAB®; Patent Mỹ số 7041870 mô tả công nghệ K-M MOUSE®, và Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2007/0061900, mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Các vùng biến đổi của người từ các kháng thể nguyên vẹn đã tạo ra bởi các con vật như vậy có thể được cải biến thêm, ví dụ, bằng cách kết hợp với một vùng hằng định khác của người.

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp dựa trên tế bào lai. Dòng tế bào u tủy của người và dòng tế bào dị u tủy của người-chuột nhắt dùng để tạo ra kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả (ví dụ, xem tài liệu: Kozbor *J. Immunol.*, 133: 3001, 1984; Brodeur et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, pp. 51-63 (Marcel Dekker, Inc., New York, 1987); và Boerner et al., *J. Immunol.*, 147: 86, 1991). Các kháng thể của người được tạo ra thông qua công nghệ tế bào lai tế bào B của người cũng được mô tả trong tài liệu: Li et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 103:3557-3562, 2006. Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Patent Mỹ số 7189826 (mô tả việc sản xuất các kháng thể IgM đơn dòng của người từ các dòng tế bào tế bào lai) và Ni, *Xiandai Mianyixue*, 26(4):265-268, 2006 (mô tả các tế bào lai người-người). Công nghệ tế bào lai ở người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong tài liệu: Vollmers and Brandlein, *Histology and Histopathology*, 20(3):927-937, 2005 và Vollmers and Brandlein, *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology*, 27(3):185-91, 2005.

Các kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập các trình tự miền biến đổi dòng vô tính Fv được chọn lọc từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn có nguồn gốc từ con người. Sau đó, các trình tự miền biến đổi như vậy có thể

được kết hợp với miền hằng định của người mong muốn. Các kỹ thuật chọn lọc các kháng thể của người từ các thư viện kháng thể được mô tả dưới đây.

5. Các kháng thể thu được từ thư viện

Các kháng thể theo sáng chế có thể được phân lập bằng cách sàng lọc các thư viện tổ hợp để có được các kháng thể có hoạt tính hoặc các hoạt tính mong muốn. Ví dụ, một loạt phương pháp là đã biết trong lĩnh vực này để tạo các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn và sàng lọc các thư viện như vậy để có được các kháng thể sở hữu đặc điểm liên kết mong muốn. Các phương pháp như vậy được tìm hiểu, ví dụ, trong tài liệu: Hoogenboom et al. trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press, Totowa, NJ, 2001) và được mô tả thêm, ví dụ, trong tài liệu: McCafferty et al., *Nature* 348:552-554; Clackson et al., *Nature* 352: 624-628, 1991; Marks et al., *J. Mol. Biol.* 222: 581-597, 1992; Marks and Bradbury, trong *Methods in Molecular Biology* 248:161-175 (Lo, ed., Human Press, Totowa, NJ, 2003); Sidhu et al., *J. Mol. Biol.* 338(2): 299-310, 2004; Lee et al., *J. Mol. Biol.* 340(5): 1073-1093, 2004; Fellouse, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 101(34): 12467-12472, 2004; và Lee et al., *J. Immunol. Methods* 284(1-2): 119-132, 2004.

Theo một số phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn nhất định, các kho gen VH và gen VL được tách dòng một cách tách biệt bằng phản ứng chuỗi polymeaza (polymerase chain reaction-PCR) và được tái tổ hợp một cách ngẫu nhiên trong các thư viện thể thực khuẩn, sau đó, các thư viện này được sàng lọc để có được thể thực khuẩn liên kết kháng nguyên như được mô tả trong tài liệu: Winter et al., *Ann. Rev. Immunol.*, 12: 433-455, 1994. Thể thực khuẩn thường biểu hiện các mảnh kháng thể, ở dạng mảnh Fv chuỗi đơn (scFv) hoặc ở dạng mảnh Fab. Các thư viện từ các nguồn được gây miễn dịch đem lại các kháng thể có ái lực cao đối với chất sinh miễn dịch mà không có yêu cầu gì về việc kiến tạo các tế bào lai. Theo cách khác, kho nguyên sơ có thể được tách dòng (ví dụ, từ con người) để đem lại một nguồn kháng thể cho nhiều kháng nguyên không tự thân và đồng thời cả kháng nguyên tự thân mà không có sự gây miễn dịch bất kỳ như được mô tả trong tài liệu Griffiths et al., *EMBO J,* 12: 725-734, 1993. Cuối cùng, cũng có thể tạo ra các thư viện nguyên sơ bằng phương pháp tổng hợp thông qua tách dòng các mảnh gen V không được sắp xếp lại từ các tế

bào gốc, và sử dụng các đoạn mồi PCR chứa trình tự ngẫu nhiên để mã hóa các vùng CDR3 biến đổi ở mức cao và để thực hiện việc sắp xếp lại *in vitro*, như được mô tả trong tài liệu Hoogenboom and Winter, *J. Mol. Biol.*, 227: 381-388, 1992. Các công bố đơn sáng chế mô tả các thư viện thể thực khuẩn kháng thể của người bao gồm, ví dụ: Patent Mỹ số 5750373, và các Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2005/0079574, 2005/0119455, 2005/0266000, 2007/0117126, 2007/0160598, 2007/0237764, 2007/0292936, và 2009/0002360. Các kháng thể hoặc các mảnh kháng thể được phân lập từ các thư viện kháng thể của người trong bản mô tả này được xem là các kháng thể của người hoặc các mảnh kháng thể của người.

6. Các kháng thể đa đặc hiệu, bao gồm các kháng thể đặc hiệu kép phụ thuộc vào tế bào T (TDB) FcRH5

Theo một khía cạnh bất kỳ trong số các khía cạnh trên đây, kháng thể kháng FcRH5 được đề cập đến trong bản mô tả này là kháng thể đa đặc hiệu, ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép. Các kháng thể đa đặc hiệu là các kháng thể đơn dòng có tính đặc hiệu liên kết đối với ít nhất hai vị trí khác nhau. Theo các phương án nhất định, các kháng thể đặc hiệu kép có thể liên kết vào hai epitop khác nhau của FcRH5.

Theo các phương án nhất định, một trong các tính đặc hiệu liên kết là đối với FcRH5 và tính đặc hiệu kia là đối với CD3 (ví dụ, CD3ε hoặc CD3γ). Các kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép như vậy còn được gọi là các kháng thể đặc hiệu kép phụ thuộc vào tế bào T (TDB) FcRH5 hoặc FcRH5 TDB. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai liên kết vào epitop trên CD3 bao gồm gốc axit amin Glu6 của CD3. Trong một số trường hợp, epitop này còn bao gồm một hoặc nhiều gốc axit amin phụ thêm được chọn từ nhóm gồm Gln1, Asp2, và Met7 của CD3. Trong một số trường hợp, epitop này bao gồm các gốc axit amin Gln1, Asp2, và Glu6 của CD3. Trong một số trường hợp, epitop này bao gồm các gốc axit amin Gln1, Asp2, Glu6, và Met7 của CD3. Trong một số trường hợp, epitop này không bao gồm gốc axit amin Glu5 của CD3. Trong một số trường hợp, epitop này không bao gồm các gốc axit amin Gly3 và Glu5 của CD3. Trong một số trường hợp, epitop này gồm các gốc axit amin Gln1, Asp2, Glu6, và Met7 của CD3.

Trong một số trường hợp khác, miền liên kết thứ hai có khả năng liên kết vào

polypeptit CD3 của người hoặc polypeptit CD3 của khỉ cyno. Trong một số trường hợp, polypeptit CD3 của người hoặc polypeptit CD3 của khỉ cyno lần lượt là polypeptit CD3ε của người hoặc polypeptit CD3ε của khỉ cyno. Trong một số trường hợp, polypeptit CD3 của người hoặc polypeptit CD3 của khỉ cyno lần lượt là polypeptit CD3γ của người hoặc polypeptit CD3γ của khỉ cyno.

Trong các trường hợp cụ thể, miền liên kết thứ hai liên kết polypeptit CD3ε của người với hằng số phân ly (K_D) ≤ 1μM, ≤ 100nM, ≤ 10nM, ≤ 1nM, ≤ 0,1nM, ≤ 0,01nM, hoặc ≤ 0,001nM (ví dụ, 10^{-8} M hoặc thấp hơn, ví dụ, từ 10^{-8} M đến 10^{-13} M, ví dụ, từ 10^{-9} M đến 10^{-13} M). Ví dụ, trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai liên kết polypeptit CD3ε của người với K_D ≤100nM (ví dụ, ≤ 90nM, ≤80nM, ≤ 70nM, ≤60nM, ≤50nM, ≤40nM, ≤30nM, ≤20nM, ≤10nM, ≤5nM, ≤ 1nM, ≤ 750pM, ≤500pM, ≤250pM, ≤100pM, ≤50pM, ≤25pM, ≤10pM, ≤5pM, hoặc ≤ 1 pM) hoặc thấp hơn.

Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 117; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 120.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123. Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%,

92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 133 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 134. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 125, 126, 127, và 128. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 129, 130, 131, và 132. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134. Do vậy, trong một số trường hợp, biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế có thể được ghép cặp với biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng CD3 38E4.v1 để tạo thành FcRH5 TDB (tức là, kháng thể kháng FcRH5/38E4.v1 TDB).

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 122; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123. Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 135 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất

80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 136. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 125, 126, 127, và 128. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 135. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 129, 130, 131, và 132. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 136. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 135 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 136. Do vậy, trong một số trường hợp, biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế có thể được ghép cặp với biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng CD3 38E4.v1 để tạo thành FcRH5 TDB (tức là, kháng thể kháng FcRH5/38E4.v1 TDB).

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 124. Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 137 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID

NO: 138. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 125, 126, 127, và 128. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 137. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 129, 130, 131, và 132. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 138. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là các SEQ ID NO: 137 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 138. Do vậy, trong một số trường hợp, biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế có thể được ghép cặp với biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng CD3 38E4.v11 để tạo thành FcRH5 TDB (tức là, kháng thể kháng FcRH5/38E4.v11 TDB).

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 139; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 140; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 141; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 142; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 143; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 144. Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 153 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 154. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung

chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 145, 146, 147, và 148. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 153. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 149, 150, 151, và 152. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 154. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là các SEQ ID NO: 153 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 154. Do vậy, trong một số trường hợp, biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế có thể được ghép cặp với biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng CD3 hu40G5c để tạo thành FcRH5 TDB (tức là, kháng thể kháng FcRH5/hu40G5c TDB).

Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 155; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 156; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 157; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 158; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 159; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 160.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 155; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 162; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 157; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 158; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 159; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 160. Trong một số trường hợp, ví dụ, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với,

hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 172 và/hoặc miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 80% (ví dụ, 80%, 81%, 82%, 83%, 84%, 85%, 86%, 87%, 88%, 89%, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 173. Trong một số trường hợp, ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nặng FR-H1, FR-H2, FR-H3, và FR-H4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 164, 165, 166, và 167. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 172. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai còn bao gồm ít nhất một (ví dụ, 1, 2, 3, hoặc 4) vùng trong số các vùng khung chuỗi nhẹ FR-L1, FR-L2, FR-L3, và FR-L4 lần lượt bao gồm các trình tự là các SEQ ID NO: 168, 169, 170, và 171. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 173. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là các SEQ ID NO: 172 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 173. Do vậy, trong một số trường hợp, biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế có thể được ghép cặp với biến thể kháng thể một nửa của kháng thể kháng CD3 huUCHT1.v9 để tạo thành FcRH5 TDB (tức là, kháng thể kháng FcRH5/huUCHT1.v9 TDB).

Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết mà liên kết FcRH5 bao gồm miền VH (VH_1) bao gồm vùng mang điện tích (CR_1) và miền VL (VL_1) bao gồm vùng mang điện tích (CR_2), trong đó CR_1 ở VH_1 tạo thành cặp điện tích với CR_2 ở VL_1. Trong một số trường hợp, CR_1 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_2 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Trong một số trường hợp, CR_1 bao gồm đột biến dạng thay thế Q39K (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_1 gồm đột biến dạng thay thế Q39K. Trong một số trường hợp, CR_2 bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_2 gồm đột biến dạng thay thế Q38E. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai mà liên kết CD3 bao gồm miền VH (VH_2) bao gồm vùng mang điện tích (CR_3) và miền VL (VL_2) bao gồm vùng mang điện tích (CR_4), trong đó CR_4 ở VL_2 tạo thành cặp điện tích với CR_3 ở VH_2. Trong một số trường hợp, CR_4 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_3 bao gồm gốc axit amin có tính axit.

Trong một số trường hợp, CR_4 bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_4 gồm đột biến dạng thay thế Q38K. Trong một số trường hợp, CR_3 bao gồm đột biến dạng thay thế Q39E (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_3 gồm đột biến dạng thay thế Q39E. Trong một số trường hợp, miền VL_1 được liên kết vào miền hằng định (CL) của chuỗi nhẹ (CL_1) và VH_1 được liên kết vào miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng ($CH1_1$), trong đó CL_1 bao gồm vùng mang điện tích (CR_5) và $CH1_1$ bao gồm vùng mang điện tích (CR_6), và trong đó CR_5 ở CL_1 tạo thành cặp điện tích với CR_6 ở $CH1_1$. Trong một số trường hợp, CR_5 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_6 bao gồm gốc có tính axit. Trong một số trường hợp, CR_5 bao gồm đột biến dạng thay thế V133K (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_5 gồm đột biến dạng thay thế V133K. Trong một số trường hợp, CR_6 bao gồm đột biến dạng thay thế S183E (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_6 gồm đột biến dạng thay thế S183E.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền VL_2 được liên kết vào miền CL (CL_2) và VH_2 được liên kết vào miền CH1 ($CH1_2$), trong đó CL_2 bao gồm vùng mang điện tích (CR_7) và $CH1_2$ bao gồm vùng mang điện tích (CR_8), và trong đó CR_8 ở $CH1_2$ tạo thành cặp điện tích với CR_7 ở CL_2. Trong một số trường hợp, CR_8 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_7 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Trong một số trường hợp, CR_8 bao gồm đột biến dạng thay thế S183K (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_8 gồm đột biến dạng thay thế S183K. Trong một số trường hợp, CR_7 bao gồm đột biến dạng thay thế V133E (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_7 gồm đột biến dạng thay thế V133E.

Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền VL_2 được liên kết vào miền CL (CL_2) và VH_2 được liên kết vào miền CH1 ($CH1_2$), trong đó CL_2 bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở các gốc axit amin F116, L135, S174, S176, và/hoặc T178 (cách đánh số Châu Âu) và $CH1_2$ bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở các gốc axit amin A141, F170, S181, S183, và/hoặc V185 (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CL_2 bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến dạng thay thế sau đây: F116A, L135V, S174A, S176F,

và/hoặc T178V. Trong một số trường hợp, CL_2 bao gồm các đột biến dạng thay thế sau đây: F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V. Trong một số trường hợp, $CH1_2$ bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến dạng thay thế sau đây: A141I, F170S, S181M, S183A, và/hoặc V185A. Trong một số trường hợp, $CH1_2$ bao gồm các đột biến dạng thay thế sau đây: A141I, F170S, S181M, S183A, và V185A.

Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền liên kết mà liên kết FcRH5 bao gồm miền VH (VH_1) bao gồm vùng mang điện tích (CR_1) và miền VL (VL_1) bao gồm vùng mang điện tích (CR_2), trong đó CR_2 ở VL_1 tạo thành cặp điện tích với CR_1 ở VH_1. Trong một số trường hợp, CR_2 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_1 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Trong một số trường hợp, CR_2 bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_2 gồm đột biến dạng thay thế Q38K. Trong một số trường hợp, CR_1 bao gồm đột biến dạng thay thế Q39E (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_1 gồm đột biến dạng thay thế Q39E. Trong một số trường hợp, miền liên kết thứ hai mà liên kết CD3 bao gồm miền VH (VH_2) bao gồm vùng mang điện tích (CR_3) và miền VL (VL_2) bao gồm vùng mang điện tích (CR_4), trong đó CR_3 ở VH_2 tạo thành cặp điện tích với CR_4 ở VL_2. Trong một số trường hợp, CR_3 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_4 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Trong một số trường hợp, CR_3 bao gồm đột biến dạng thay thế Q39K (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_3 gồm đột biến dạng thay thế Q39K. Trong một số trường hợp, CR_4 bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_4 gồm đột biến dạng thay thế Q38E. Trong một số trường hợp, miền VL_1 được liên kết vào miền hằng định (CL) của chuỗi nhẹ (CL_1) và VH_1 được liên kết vào miền hằng định thứ nhất (CH1) của chuỗi nặng ($CH1_1$), trong đó CL_1 bao gồm vùng mang điện tích (CR_5) và $CH1_1$ bao gồm vùng mang điện tích (CR_6), và trong đó CR_6 ở $CH1_1$ tạo thành cặp điện tích với CR_5 ở CL_1. Trong một số trường hợp, CR_6 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_5 bao gồm gốc axit amin có tính axit. Trong một số trường hợp, CR_6 bao gồm đột biến dạng thay thế S183K (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_6 gồm đột biến dạng thay thế S183K. Trong một số trường hợp, CR_5 bao gồm đột biến dạng thay thế V133E (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_5 gồm đột biến dạng

thay thế V133E.

Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền VL_2 được liên kết vào miền CL (CL_2) và VH_2 được liên kết vào miền CH1 ($CH1_2$), trong đó CL_2 bao gồm vùng mang điện tích (CR_7) và $CH1_2$ bao gồm vùng mang điện tích (CR_8), và trong đó CR_7 ở CL_2 tạo thành cặp mang điện tích với CR_8 ở $CH1_2$. Trong một số trường hợp, CR_7 bao gồm gốc axit amin có tính bazơ và CR_8 bao gồm gốc có tính axit. Trong một số trường hợp, CR_7 bao gồm đột biến dạng thay thế V133K (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_7 gồm đột biến dạng thay thế V133K. Trong một số trường hợp, CR_8 bao gồm đột biến dạng thay thế S183E (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CR_8 gồm đột biến dạng thay thế S183E.

Trong một số trường hợp, ví dụ, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5, trong đó miền VL_2 được liên kết vào miền CL (CL_2) và VH_2 được liên kết vào miền CH1 ($CH1_2$), trong đó CL_2 bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở các gốc axit amin F116, L135, S174, S176, và/hoặc T178 (cách đánh số Châu Âu) và $CH1_2$ bao gồm một hoặc nhiều đột biến ở các gốc axit amin A141, F170, S181, S183, và/hoặc V185 (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, CL_2 bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến dạng thay thế sau đây: F116A, L135V, S174A, S176F, và/hoặc T178V. Trong một số trường hợp, CL_2 bao gồm các đột biến dạng thay thế sau đây: F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V. Trong một số trường hợp, $CH1_2$ bao gồm một hoặc nhiều đột biến trong số các đột biến dạng thay thế sau đây: A141I, F170S, S181M, S183A, và/hoặc V185A. Trong một số trường hợp, $CH1_2$ bao gồm các đột biến dạng thay thế sau đây: A141I, F170S, S181M, S183A, và V185A. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm một hoặc nhiều miền hằng định chuỗi nặng, trong đó một hoặc nhiều miền hằng định chuỗi nặng được chọn từ trong số miền CH2 thứ nhất ($CH2_1$), miền CH3 thứ nhất ($CH3_1$), miền CH2 thứ hai ($CH2_2$), và miền CH3 thứ hai ($CH3_2$). Trong một số trường hợp, ít nhất một trong số một hoặc nhiều miền hằng định chuỗi nặng này được ghép cặp với một miền hằng định chuỗi nặng khác. Trong một số trường hợp, mỗi $CH3_1$ và $CH3_2$ bao gồm phần lồi (P_1) hoặc khoang (C_1), và P_1 hoặc C_1 ở $CH3_1$ lần lượt có thể đặt được vào C_1 hoặc P_1, ở $CH3_2$.

Trong một số trường hợp, $CH3_1$ và $CH3_2$ giao nhau ở mặt phân cách giữa P_1 và C_1. Trong một số trường hợp, mỗi $CH2_1$ và $CH2_2$ bao gồm (P_2) hoặc khoang (C_2), và P_2 hoặc C_2 ở $CH2_1$ lần lượt có thể đặt được vào C_2 hoặc P_2, ở $CH2_2$. Trong một số trường hợp, $CH2_1$ và $CH2_2$ giao nhau ở mặt phân cách giữa P_2 và C_2.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO:121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó mỗi trong số nhánh kháng FcRH5 và nhánh kháng CD3 bao gồm đột biến dạng thay thế N297G (cách đánh số Châu Âu); và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm đột biến dạng thay thế T366W và nhánh kháng CD3 bao gồm đột biến dạng thay thế T366S, L368A, và Y407V. Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm

trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó mỗi trong số nhánh kháng FcRH5 và nhánh kháng CD3 bao gồm đột biến dạng thay thế N297G (cách đánh số Châu Âu); và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm đột biến dạng thay thế T366W và nhánh kháng CD3 bao gồm đột biến dạng thay thế T366S, L368A, và Y407V.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ: (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G; và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là

SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G; và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G; và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH

bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G; và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G; và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit

amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G; và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G; và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH

bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G; và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G; và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38K, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID

NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G; và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38K, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38K, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38E và đột biến dạng thay thế V133K và chuỗi nặng bao

gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, S183E, và N297G; và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38K, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm ít nhất một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu vùng siêu biến (HVR) được chọn từ (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G; và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38E, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là

SEQ ID NO: 12; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu vùng siêu biến (HVR): (a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115; (b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116; (c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121; (d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118; (e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và (f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123; và trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G; và trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38E, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất 90% (ví dụ, 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99%) với, hoặc trình tự là, SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G; và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38E, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu). Trong một số trường hợp, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm: (a) nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID

NO: 104 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105, trong đó nhánh kháng FcRH5 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm đột biến dạng thay thế Q38K và đột biến dạng thay thế V133E và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39E, S183K, và N297G; và (b) nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO:133 và miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 134, trong đó nhánh kháng CD3 bao gồm chuỗi nhẹ bao gồm các đột biến dạng thay thế Q38E, F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V và chuỗi nặng bao gồm các đột biến dạng thay thế Q39K, A141I, F170S, S181M, S183A, V185A, và N297G (cách đánh số Châu Âu).

7. Các biến thể kháng thể

Theo các phương án nhất định, các biến thể trình tự axit amin của các kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, các kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, như các kháng thể FcRH5 TDB theo sáng chế hoặc các biến thể của chúng) được dự liệu. Ví dụ, mong muốn là có thể cải thiện được ái lực liên kết và/hoặc các thuộc tính sinh học khác của kháng thể. Các biến thể trình tự axit amin của kháng thể có thể được tạo ra bằng cách đưa các cải biến thích hợp vào trình tự nucleotit mã hóa kháng thể, hoặc bằng phương pháp tổng hợp peptit. Các cải biến như vậy bao gồm, ví dụ, cải biến dạng làm khuyết khỏi, và/hoặc dạng cài xen vào và/hoặc dạng thay thế các gốc trong các trình tự axit amin của kháng thể. Dạng kết hợp bất kỳ của các cải biến dạng làm khuyết, dạng cài xen, và dạng thay thế có thể được tạo ra để đạt tới cấu trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng này sở hữu các đặc điểm mong muốn, ví dụ, khả năng liên kết kháng nguyên.

a. Các biến thể dạng thay thế, dạng cài xen và dạng làm khuyết

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến các biến thể kháng thể có một hoặc nhiều cải biến dạng thay thế axit amin. Các vị trí đang được quan tâm để gây đột biến dạng thay thế bao gồm các HVR và các FR. Các cải biến dạng thay thế bảo toàn được thể hiện ở bảng 1 dưới tiêu đề "các cải biến dạng thay thế được ưu tiên". Nhiều thay đổi đáng kể nữa được đề cập đến trong bảng 1 dưới tiêu đề "các cải biến dạng thay thế làm ví dụ", và như được mô tả thêm dưới đây liên quan đến các

nhóm chuỗi bên axit amin. Các cải biến dạng thay thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể đang được quan tâm và các sản phẩm này được sàng lọc để có được hoạt tính mong muốn, ví dụ, tính liên kết kháng nguyên giữ nguyên/cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm, hoặc CDC hoặc ADCC được cải thiện.

Bảng 1. Các cải biến dạng thay thế axit amin được ưu tiên và làm ví dụ

Gốc ban đầu	Các cải biến dạng thay thế làm ví dụ	Các cải biến dạng thay thế 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

Các axit amin có thể được chia nhóm theo các thuộc tính chuỗi bên chung:

(1) kỵ nước: Norleuxin, Met, Ala, Val, Leu, Ile;

(2) ưa nước trung tính: Cys, Ser, Thr, Asn, Gln;

(3) có tính axit: Asp, Glu;

(4) có tính bazơ: His, Lys, Arg;

(5) các gốc ảnh hưởng đến tính định hướng chuỗi: Gly, Pro;

(6) thơm: Trp, Tyr, Phe.

Các cải biến dạng thay thế không bảo toàn sẽ dẫn đến sự trao đổi thành viên của một nhóm trong số các nhóm này cho một nhóm khác.

Một loại biến thể dạng thay thế liên quan đến việc thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể ban đầu (ví dụ, kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể của người). Nhìn chung, (các) biến thể thu được được chọn để nghiên cứu thêm sẽ có các cải biến (ví dụ, cải thiện) về một số thuộc tính sinh học nhất định (ví dụ, ái lực tăng, tính sinh miễn dịch giảm) so với kháng thể ban đầu và/hoặc sẽ có một số thuộc tính sinh học nhất định về cơ bản được giữ nguyên của kháng thể ban đầu. Một biến thể dạng thay thế làm ví dụ là kháng thể được làm trưởng thành ái lực, kháng thể này có thể được tạo ra một cách thuận tiện, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật làm trưởng thành ái lực dựa vào sự biểu hiện thể thực khuẩn như những kỹ thuật được mô tả trong bản mô tả này. Nói một cách ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được gây đột biến và các kháng thể biến thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc để có được một hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực liên kết).

Các cải biến dạng thay đổi (ví dụ, thay thế) có thể được tạo ra ở các HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực kháng thể. Các cải biến dạng thay đổi như vậy có thể được tạo ra ở "các điểm nóng" của HVR, tức là, các gốc được mã hóa bởi các codon mà trải qua quá trình đột biến ở tần suất cao trong suốt quá trình làm trưởng thành tế bào cơ thể (ví dụ, xem tài liệu: Chowdhury, *Methods Mol. Biol.* 207:179-196, 2008), và/hoặc các gốc mà tiếp xúc với kháng nguyên, với VH hoặc VL biến thể thu được được kiểm tra về ái lực liên kết. Quá trình làm trưởng thành ái lực bằng cách kiến tạo và tái chọn lọc từ các thư viện thứ cấp đã được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Hoogenboom et al. trong *Methods in Molecular Biology* 178:1-37 (O'Brien et al., ed., Human Press,

Totowa, NJ, (2001)). Theo một số phương án của quá trình làm trưởng thành ái lực, tính đa dạng được đưa vào các gen biến đổi được chọn để làm trưởng thành bằng phương pháp bất kỳ trong số một loạt phương pháp (ví dụ, kỹ thuật PCR tạo lỗi ngẫu nhiên, xáo trộn chuỗi, hoặc gây đột biến định hướng bằng oligonucleotit). Sau đó, thư viện thứ cấp được tạo ra. Sau đó, thư viện này được sàng lọc để nhận diện các biến thể kháng thể bất kỳ có ái lực mong muốn. Một phương pháp khác để đưa tính đa dạng vào bao gồm các phương pháp định hướng bằng HVR, trong đó một vài gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc một lần) được lấy ngẫu nhiên. Các gốc HVR liên quan đến khả năng liên kết kháng nguyên có thể được nhận diện một cách cụ thể, ví dụ, bằng cách sử dụng phương pháp tạo đột biến nhờ quét vào alanin hoặc lập mô hình. Cụ thể, CDR-H3 và CDR-L3 thường được hướng đích.

Theo các phương án nhất định, các cải biến dạng thay thế, dạng cài xen, hoặc dạng làm khuyết có thể diễn ra trong phạm vi một hoặc nhiều HVR với điều kiện là các thay đổi như vậy về cơ bản không làm giảm khả năng của kháng thể trong việc liên kết kháng nguyên. Ví dụ, các thay đổi bảo toàn (ví dụ, các thay thế bảo toàn như được đề cập đến trong bản mô tả này) mà về cơ bản không làm giảm ái lực liên kết có thể được tạo ra trong các HVR. Các thay đổi như vậy có thể, ví dụ, nằm bên ngoài các gốc tiếp xúc kháng nguyên trong các HVR. Theo các phương án nhất định về các trình tự VH và VL biến thể được đề cập đến ở trên, mỗi HVR không được thay đổi, hoặc chứa không nhiều hơn một, hai hoặc ba cải biến dạng thay thế axit amin.

Một phương pháp hữu ích dùng cho việc nhận diện các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể được hướng đích để gây đột biến được gọi là "phương pháp gây đột biến nhờ quét vào alanin" như được mô tả trong tài liệu: Cunningham and Wells (1989) *Science*, 244:1081-1085. Theo phương pháp này, gốc hoặc nhóm gồm các gốc đích (ví dụ, các gốc mang điện tích như arg, asp, his, lys, và glu) được nhận diện và được thay thế bằng một axit amin trung tính hoặc axit amin mang điện tích âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem liệu sự tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các thay thế khác nữa có thể được đưa vào các vị trí axit amin thể hiện tính nhạy chức năng đối với các cải biến dạng thay thế ban đầu. Ngoài ra hoặc theo cách khác, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng

nguyên-kháng thể để nhận diện các điểm tiếp xúc giữa kháng thể và kháng nguyên. Các gốc tiếp xúc này và các gốc lân cận có thể được hướng đích hoặc được loại trừ trong vai trò là ứng viên để thay thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem liệu chúng có chứa các thuộc tính mong muốn hay không.

Các cải biến dạng cài xen trình tự axit amin bao gồm các dạng dung hợp đầu tận cùng amin và/hoặc đầu tận cùng carboxyl có độ dài nằm trong khoảng từ một gốc đến các polypeptit chứa một trăm gốc trở lên, cũng như các cải biến dạng cài xen nội trình tự của một gốc axit amin đơn lẻ hoặc nhiều gốc axit amin. Các ví dụ về cải biến dạng cài xen đầu tận cùng bao gồm kháng thể có gốc methionyl đầu tận cùng N. Các biến thể dạng cài xen khác của phân tử kháng thể bao gồm dạng dung hợp vào đầu tận cùng N hoặc đầu tận cùng C của kháng thể với enzym (ví dụ đối với ADEPT) hoặc polypeptit mà làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể.

b. Các biến thể glycosyl hóa

Theo các phương án nhất định, các kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế có thể được thay đổi để làm tăng hoặc làm giảm mức độ mà tại đó kháng thể được glycosyl hóa. Việc thêm vào hoặc làm khuyết đi các vị trí glycosyl hóa đối với kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế có thể được thực hiện một cách thuận tiện bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc được loại bỏ. Việc thêm vào hoặc loại bỏ đi vị trí glycosyl hóa có thể làm thay đổi chức năng tác động của kháng thể, như kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB). Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB) có thể chứa đột biến vị trí không glycosyl hóa. Theo một số phương án, đột biến vị trí không glycosyl hóa này là đột biến dạng thay thế. Theo một số phương án, đột biến vị trí không glycosyl hóa này làm giảm chức năng tác động của kháng thể kháng FcRH5 đi ít nhất 1% hoặc hơn 1% (ví dụ, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90% hoặc hơn 90%). Theo một số phương án, đột biến dạng thay thế này là ở các gốc axit amin N297, L234, L235, D265, và/hoặc P329 (cách đánh số Châu Âu). Theo một số phương án, đột biến dạng thay thế này được chọn từ nhóm gồm N297G, N297A, L234A, L235A, D265A, và P329G. Theo một số phương án, đột biến dạng thay thế này là đột biến N297G.

Trong trường hợp kháng thể này bao gồm vùng Fc, thì carbohydrat được gắn kết vào đó có thể được thay đổi. Các kháng thể nguyên thể được tạo ra bởi các tế bào động vật có vú thường bao gồm oligosacarit cấu trúc anten kép, mạch nhánh mà nhìn chung được gắn thông qua liên kết N vào Asn297 của miền CH2 của vùng Fc. Ví dụ, xem tài liệu: Wright et al. *TIBTECH* 15:26-32, 1997. Oligosacarit này có thể bao gồm nhiều carbohydrat khác nhau, ví dụ, manoza, N-axetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza được gắn kết vào GlcNAc trong "thân" của oligosacarit cấu trúc anten kép. Theo một số phương án, các cải biến oligosacarit trong kháng thể theo sáng chế có thể được thực hiện để tạo ra các biến thể kháng thể có một số thuộc tính cải thiện nhất định.

Theo một phương án, các biến thể kháng thể kháng FcRH5 được đề cập đến có cấu trúc carbohydrat thiếu fucoza gắn kết (một cách trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể như vậy có thể là từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng fucoza được xác định bằng cách tính lượng fucoza trung bình trong chuỗi đường ở Asn297, so với tổng lượng của tất cả các cấu trúc glyco được gắn kết với Asn297 (ví dụ, các cấu trúc manoza phức hợp, lai và cao) như đo được bằng phép đo phổ khối MALDI-TOF, ví dụ, theo mô tả trong Công bố đơn quốc tế số WO 2008/077546. Asn297 dùng để chỉ gốc asparagin nằm ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (cách đánh số Châu Âu cho các gốc vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể nằm ở khoảng ± 3 axit amin phía trước hoặc phía sau vị trí 297, tức là, nằm trong khoảng vị trí từ 294 đến 300, do các thay đổi trình tự phụ ở các kháng thể. Các biến thể fucosyl hóa như vậy có thể có chức năng ADCC được cải thiện. Ví dụ, xem tài liệu: các Công bố đơn sáng chế Mỹ số US 2003/0157108 (Presta, L.); US 2004/0093621 (Kyowa Hakko Kogyo Co., Ltd). Các ví dụ về các công bố liên quan đến biến thể kháng thể "được khử fucosyl" hoặc "thiếu hụt fucoza" 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; WO2005/053742; WO2002/031140; Okazaki et al. *J. Mol. Biol.* 336:1239-1249, 2004; Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614, 2004. Các ví dụ về các dòng tế bào có khả năng sản

xuất ra các kháng thể được khử fucosyl bao gồm các tế bào Lec13 CHO thiếu hụt khả năng fucosyl hóa protein (Ripka et al. *Arch. Biochem. Biophys.* 249:533-545, 1986; Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Mỹ số US 2003/0157108 A1, Presta, L; và Công bố đơn quốc tế số WO 2004/056312 A1, Adams *et al.*, cụ thể là ở Ví dụ 11), và các dòng tế bào bất hoạt, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8,* các tế bào CHO bất hoạt (ví dụ, xem tài liệu: Yamane-Ohnuki et al. *Biotech. Bioeng.* 87: 614, 2004; Kanda, Y. et al., *Biotechnol. Bioeng.*, 94(4):680-688, 2006; và Công bố đơn quốc tế số WO2003/085107).

Ví dụ, các biến thể kháng thể kháng FcRH5 còn được cung cấp thêm các oligosacarit chia đôi mà trong đó oligosacarit cấu trúc anten kép đã gắn kết vào vùng Fc của kháng thể đó được chia đôi bởi GlcNAc. Các biến thể kháng thể như vậy có thể có mức fucosyl hóa giảm và/hoặc chức năng ADCC cải thiện. Các ví dụ về các biến thể kháng thể như vậy được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn quốc tế số WO 2003/011878 (Jean-Mairet et al.); Patent Mỹ số 6602684 (Umana et al.); và US 2005/0123546 (Umana *et al.*). Các biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactoza trong oligosacarit đã gắn kết vào vùng Fc cũng được đề cập. Các biến thể kháng thể như vậy có thể có chức năng CDC được cải thiện. Các biến thể kháng thể như vậy được mô tả, ví dụ, trong Công bố đơn quốc tế số WO 1997/30087 (Patel et al.); WO 1998/58964 (Raju, S.); và WO 1999/22764 (Raju, S.).

c. Các biến thể miền VH, VL, CH1, và CL

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào miền biến đổi chuỗi nặng (VH, ví dụ, VH_1 và/hoặc VH_2), miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL, ví dụ, VL_1 và/hoặc VL_2), miền hằng định chuỗi nặng (CH1, ví dụ, $CH1_1$ và/hoặc $CH1_2$), và/hoặc miền hằng định chuỗi nhẹ (CL, ví dụ, CL_1 và/hoặc CL_2) của kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, kháng thể FcRH5 TDB theo sáng chế hoặc biến thể của nó). Các miền VH, VL, CH1, và/hoặc CL có thể có các cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10). Theo các phương án cụ thể, các thay thế axit amin bao gồm các gốc axit amin có tính axit và/hoặc các gốc axit amin

có tính bazơ. Các cải biến axit amin, có thể tạo ra các vùng mang điện tích trong các miền VH, VL, CH1, và/hoặc CL (ví dụ, các vùng bao gồm các gốc axit amin có tính axit và/hoặc các gốc axit amin có tính bazơ). Các vùng mang điện tích trong các miền VH, VL, CH1, và/hoặc CL có thể tương tác với vùng mang điện tích thứ hai có điện tích toàn phần đối ngược để tạo thành cặp điện tích. Ví dụ, các cải biến axit amin có thể điều tiết quá trình tạo thành cặp điện tích giữa các vùng mang điện tích có mặt trong các miền VL_1 và VH_1 của nhánh FcRH5 của TDB. Trong một số trường hợp, các cải biến axit amin có thể điều tiết quá trình tạo thành cặp điện tích giữa các vùng mang điện tích có mặt trong các miền CL_1 và $CH1_1$ của nhánh FcRH5 của TDB. Trong một số trường hợp, các cải biến axit amin có thể điều tiết quá trình tạo thành cặp điện tích giữa các vùng mang điện tích có mặt trong các miền VL_2 và VH_2 của nhánh thứ hai của TDB (ví dụ, nhánh CD3 của TDB). Trong một số trường hợp, các cải biến axit amin có thể điều tiết quá trình tạo thành cặp điện tích giữa các vùng mang điện tích có mặt trong các miền CL_2 và $CH1_2$ của nhánh thứ hai của TDB (ví dụ, nhánh CD3 của TDB). Các dạng kết cấu làm ví dụ của FcRH5 TDB chứa các biến thể miền VH, VL, CH1, và/hoặc CL được trình bày trên các hình vẽ Fig.1A-Fig.1D.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, như kháng thể FcRH5 TDB theo sáng chế) bao gồm một hoặc nhiều cải biến không đối xứng ở các vùng VH, VL, CH1, và/hoặc CL để tạo thuận lợi cho quá trình ghép cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ chính xác. Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm một hoặc nhiều cải biến trong vùng Fc để tạo thuận lợi cho quá trình heterodime hóa hai nhánh (ví dụ, nhánh kháng FcRH5 và nhánh kháng CD3) của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB).

Theo một số phương án, miền $CH1_1$ bao gồm cải biến dạng thay thế axit amin ở S183 (cách đánh số Châu Âu) và miền CL_1 bao gồm cải biến dạng thay thế axit amin ở V133 (cách đánh số Châu Âu). Theo các phương án khác, chuỗi nhẹ của nhánh thứ nhất (ví dụ, nhánh liên kết FcRH5) của kháng thể kháng FcRH5 là chuỗi kappa. Theo một số phương án, chuỗi nhẹ của nhánh thứ hai (ví dụ, nhánh liên kết

kháng CD3) của kháng thể kháng FcRH5 là chuỗi kappa. Theo các phương án nhất định, các chuỗi nhẹ ở cả hai nhánh của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, nhánh liên kết FcRH5 và nhánh liên kết CD3) đều là chuỗi kappa.

Theo một số phương án, miền $CH1_1$ bao gồm đột biến S183E và miền CL_1 bao gồm đột biến V133K. Theo các phương án khác, miền $CH1_1$ bao gồm đột biến S183K và miền CL_1 bao gồm đột biến V133E.

Theo một số phương án, miền $CH1_1$ bao gồm đột biến S183K, miền CL_1 bao gồm đột biến V133E, miền $CH1_2$ bao gồm đột biến S183E, và miền CL_2 bao gồm đột biến V133K.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm đột biến Q39E ở miền VH_1, đột biến Q38K ở miền VL_1, đột biến Q39K ở miền VH_2, và đột biến Q38E ở miền VL_2.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm đột biến chốt (ví dụ, phần lồi) ở miền $CH3_1$ và đột biến lỗ (ví dụ, khoang) ở miền $CH3_2$. Theo các phương án nhất định, đột biến chốt bao gồm đột biến T366W (cách đánh số Châu Âu). Theo các phương án nhất định, đột biến lỗ bao gồm ít nhất một, ít nhất hai, hoặc toàn bộ ba đột biến trong số các đột biến T366S, L368A, và Y407V (cách đánh số Châu Âu). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng FcRH5 còn bao gồm đột biến T366W trong chuỗi nặng thứ nhất và các đột biến T366S, L368A, và Y407V trong chuỗi nặng thứ hai.

Theo một số phương án, miền $CH1_1$ bao gồm các đột biến A141I, F170S, S181M, S183A, và V185A và miền CL_1 bao gồm các đột biến F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V. Theo các phương án khác nhất định, miền $CH1_1$ bao gồm các đột biến A141I, F170S, S181M, S183A, và V185A; miền CL_1 bao gồm các đột biến F116A, L135V, S174A, S176F, và T178V; miền $CH1_2$ bao gồm đột biến S183E; và miền CL_2 bao gồm đột biến V133K.

d. Các biến thể vùng Fc

Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng

FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, như kháng thể TDB theo sáng chế hoặc biến thể của nó), nhờ đó tạo ra biến thể vùng Fc (ví dụ, xem tài liệu: Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2012/0251531, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Theo các phương án khác nhất định, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm một hoặc nhiều cải biến trong vùng Fc để tạo thuận lợi cho quá trình heterodime hóa hai nhánh (ví dụ, nhánh kháng FcRH5 và nhánh kháng CD3) của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB). Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB) mà có một hoặc nhiều cải biến Fc cũng có thể có một hoặc nhiều cải biến ở các miền VH, VL, CH1, và/hoặc CL, như được mô tả ở trên. Theo một số phương án, kháng thể FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB) chứa các cải biến Fc, VH, VL, CH1, và/hoặc CL có thể được tạo ra bằng phương pháp sản xuất kháng thể một tế bào, như được mô tả trong bản mô tả này. Biến thể vùng Fc có thể bao gồm trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc của IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) bao gồm cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể kháng FcRH5 sở hữu một số, nhưng không phải là tất cả các chức năng tác động, những chức năng này làm cho biến thể đó trở thành ứng viên thích hợp cho các ứng dụng mà trong đó thời gian bán hủy của kháng thể *in vivo* là quan trọng còn một số chức năng tác động nhất định (như bổ thể và ADCC) thì không cần thiết hoặc có hại. Các thử nghiệm độc tính tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được thực hiện để xác nhận mức giảm/tiêu tan hoạt tính CDC và/hoặc hoạt tính ADCC. Ví dụ, các thử nghiệm liên kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể này thiếu khả năng liên kết FcγR (do đó chắc chắn là thiếu hoạt tính ADCC), nhưng giữ lại khả năng liên kết FcRn. Các tế bào sơ cấp dùng để điều tiết ADCC, các tế bào NK, chỉ biểu hiện duy nhất FcγRIII, trong khi đó các bạch cầu đơn nhân to biểu hiện FcγRI, FcγRII và FcγRIII. Sự biểu hiện FcR trên các tế bào tạo máu được tóm tắt trong bảng 3 ở trang 464 thuộc tài liệu: Ravetch et al., *Annu. Rev. Immunol.* 9:457-492, 1991. Các ví dụ không giới hạn về các thử nghiệm *in vitro* nhằm đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang được quan tâm được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 5500362 (ví

dụ, xem tài liệu: Hellstrom et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 83:7059-7063, 1986) và Hellstrom, et al., *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 82:1499-1502, 1985; 5,821,337 (xem tài liệu: Bruggemann, et al., *J. Exp. Med.* 166:1351-1361, 1987). Theo cách khác, các phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (ví dụ, xem tài liệu: thử nghiệm độc tính tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTI™ dùng cho phép đo đếm tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm độc tính tế bào không có hoạt tính phóng xạ CytoTox 96® (Promega, Madison, WI). Các tế bào tác động hữu ích cho các thử nghiệm như vậy bao gồm các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (peripheral blood mononuclear cell-PBMC) và các tế bào tiêu diệt tự nhiên (Natural Killer-NK). Ngoài ra hoặc theo cách khác, hoạt tính ADCC của phân tử đang được quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, ở mô hình động vật như mô hình được bộc lộ trong tài liệu: Clynes et al. *Proc. Nat'l Acad. Sci. USA* 95:652-656, 1998. Các thử nghiệm liên kết C1q cũng có thể được thực hiện để xác nhận rằng kháng thể này không thể liên kết C1q và do đó thiếu hoạt tính CDC. Ví dụ, xem tài liệu: phương pháp ELISA liên kết C3c và C1q trong Công bố đơn quốc tế số WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá quá trình hoạt hóa bổ thể, có thể thực hiện thử nghiệm CDC (ví dụ, xem tài liệu: Gazzano-Santoro *et al.J. Immunol. Methods* 202:163, 1996; Cragg, M.S. et al. *Blood.* 101:1045-1052, 2003; và Cragg, M.S. and M.J. Glennie *Blood.* 103:2738-2743, 2004). Các biện pháp xác định khả năng liên kết FcRn và độ thanh thải/thời gian bán hủy *in vivo* cũng có thể được thực hiện bằng cách sử dụng các phương pháp đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này (ví dụ, xem tài liệu: Petkova, S.B. et al.*Int'l. Immunol.* 18(12):1759-1769, 2006).

Các kháng thể có chức năng tác động giảm bao gồm những loại có cải biến dạng thay thế ở một hoặc nhiều gốc trong số các gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (các Patent Mỹ số 6737056 và 8219149). Các thể đột biến Fc như vậy bao gồm các thể đột biến Fc có cải biến dạng thay thế ở hai vị trí trở lên trong số các vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến gọi là thể đột biến Fc "DANA" có cải biến dạng thay thế các gốc 265 và 297 thành alanin (Patent Mỹ số 7332581và 8219149).

Theo các phương án nhất định, prolin ở vị trí 329 của vùng Fc người loại hoang dại trong kháng thể này được thế bằng glyxin hoặc arginin hoặc gốc axit amin đủ lớn để phá hủy cấu trúc nhiều lớp prolin bên trong mặt phân cách thụ thể Fc/Fc.gama. mà được tạo thành giữa prolin 329 của Fc và các gốc tryptophan Trp87 và Trp110 của FcgRIII (Sondermann et al. *Nature* 406, 267-273, 2000). Theo các phương án nhất định, kháng thể bao gồm cải biến dạng thay thế ít nhất một axit amin khác nữa. Theo một phương án, cải biến dạng thay thế axit amin khác nữa này là S228P, E233P, L234A, L235A, L235E, N297A, N297D, hoặc P331S, và còn theo một phương án khác, cải biến dạng thay thế ít nhất một axit amin khác nữa này là L234A và L235A của vùng Fc của IgG1 người hoặc S228P và L235E của vùng Fc của IgG4 người (ví dụ, xem tài liệu: US 2012/0251531), và còn theo một phương án khác, cải biến dạng thay thế ít nhất một axit amin khác nữa này là L234A và L235A và P329G thuộc vùng Fc của IgG1 người.

Một số biến thể kháng thể nhất định có mức liên kết vào các FcR được cải thiện hoặc giảm bớt được mô tả (ví dụ, xem tài liệu: Patent Mỹ số 6737056; Công bố đơn quốc tế số WO 2004/056312, và Shields et al., *J. Biol. Chem.* 9(2): 6591-6604, 2001).

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

Theo một số phương án, các thay đổi được tạo ra ở vùng Fc mà dẫn đến thay đổi (tức là, cải thiện hoặc giảm bớt) khả năng liên kết C1q và/hoặc độc tính tế bào phụ thuộc vào bổ thể (Complement Dependent Cytotoxicity-CDC), ví dụ, như được mô tả trong Patent Mỹ số 6194551, Công bố đơn quốc tế số WO 99/51642, và Idusogie et al. *J. Immunol.* 164: 4178-4184, 2000.

Các kháng thể có thời gian bán hủy tăng lên và khả năng liên kết vào thụ thể Fc sơ sinh (FcRn) được cải thiện, mà chịu trách nhiệm chuyển các IgG từ mẹ sang bào thai (Guyer et al., *J. Immunol.*117:587, 1976;Kim et al., *J. Immunol.* 24:249, 1994), được mô tả trong tài liệu: US2005/0014934A1 (Hinton et al.). Các kháng thể

đó bao gồm vùng Fc có một hoặc nhiều cải biến dạng thay thế trong đó mà cải thiện khả năng liên kết vùng Fc vào FcRn. Các biến thể Fc như vậy bao gồm những loại có cải biến dạng thay thế ở một hoặc nhiều gốc trong số các 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, cải biến dạng thay thế vùng Fc gốc 434 (Patent Mỹ số 7371826).

Xem thêm tài liệu: Duncan et al. *Nature* 322:738-40, 1988; Patent Mỹ số 5648260; Patent Mỹ số 5624821; và Công bố đơn quốc tế số WO 94/29351 liên quan đến các ví dụ khác về các biến thể vùng Fc.

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng FcRH5 bao gồm đột biến vị trí không glycosyl hóa. Đột biến vị trí không glycosyl hóa này có thể là đột biến dạng thay thế. Đột biến vị trí không glycosyl hóa này có thể làm giảm chức năng tác động của kháng thể kháng FcRH5, khi so với phiên bản không được gây đột biến, đi ít nhất là 1% (ví dụ, 2%, 3%, 4%, 5%, 6%, 7%, 8%, 9%, 10%, 20%, 30%, 40%, 50%, 60%, 70%, 80%, hoặc 90%) hoặc nhiều hơn. Trong một số trường hợp, đột biến dạng thay thế này là ở các gốc axit amin N297, L234, L235, D265, và/hoặc P329 (cách đánh số Châu Âu). Ngoài ra, đột biến dạng thay thế này có thể được chọn từ nhóm gồm N297G, N297A, L234A, L235A, D265A, và P329G. Trong các trường hợp cụ thể, đột biến dạng thay thế này là đột biến N297G.

e. Các biến thể chốt và lỗ

Cũng có thể tạo ra biến thể chốt và lỗ của các kháng thể mà trong đó cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều gốc axit amin (ví dụ, 1, 2, 3, 4, 5, 6, 7, 8, 9, hoặc 10) tạo ra phần lồi (chốt) hoặc khoang (lỗ). Trong một số trường hợp, phần lồi nằm trên một polypeptit của kháng thể có thể đặt được trong khoang nằm trên polypeptit thứ hai của kháng thể đó sao cho hai cấu tử polypeptit của kháng thể này có thể giao nhau ở mặt phân cách giữa phần lồi và khoang. Có thể tạo ra chốt bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin bằng một hoặc nhiều gốc axit amin có kích cỡ lớn hơn. Có thể tạo ra khoang bằng cách thay thế một hoặc nhiều gốc axit amin bằng một hoặc nhiều gốc axit amin có kích cỡ nhỏ hơn. Có thể đưa phần lồi hoặc khoang vào một trong hai nhánh của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5

TDB (ví dụ, nhánh kháng FcRH5 hoặc nhánh kháng CD3)). Các cải biến chốt và lỗ (ví dụ, của miền Fc) là đặc biệt hữu ích trong việc làm tăng tổng sản lượng, độ thuần nhất, và độ ổn định của các kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, TDB). Trong một số trường hợp (ví dụ, khi cặp phần lồi-khoang này nằm trên mặt phân cách LC/HC (ví dụ, VH và VL hoặc CL và CH1)), thì các cải biến axit amin mà đưa các cải biến chốt và lỗ vào có thể làm giảm mức trao đổi chuỗi nhẹ. Theo một số phương án, phần lồi được tạo thành bằng cách đưa đột biến T366W vào một nhánh của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, nhánh kháng FcRH5 hoặc nhánh kháng CD3). Theo một số phương án, đột biến T366W là ở nhánh kháng FcRH5. Theo một số phương án, đột biến T366W là ở nhánh kháng CD3. Theo một số phương án, khoang được tạo thành bằng cách đưa đột biến T366W, L368A, và/hoặc Y407V vào một nhánh của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, nhánh kháng FcRH5 hoặc nhánh kháng CD3). Theo một số phương án, đột biến T366W, L368A, và/hoặc Y407V là ở nhánh kháng FcRH5. Theo một số phương án, đột biến T366W, L368A, và/hoặc Y407V là ở nhánh kháng CD3.

Các kỹ thuật dùng để tạo các kháng thể đa đặc hiệu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, kỹ thuật đồng biểu hiện tái tổ hợp của hai cặp chuỗi nặng-chuỗi nhẹ của globulin miễn dịch có các tính đặc hiệu khác nhau (xem tài liệu: Milstein and Cuello, *Nature* 305: 537 (1983)), WO 93/08829, và Traunecker et al., *EMBO J.* 10: 3655 (1991)), và kỹ thuật xử lý "chốt-trong-lỗ" (ví dụ, xem tài liệu: patent Mỹ số 5731168). Kỹ thuật xử lý "chốt-trong-lỗ" cho các kháng thể đa đặc hiệu có thể được sử dụng để tạo ra nhánh thứ nhất chứa chốt và nhánh thứ hai chứa lỗ mà chốt của nhánh thứ nhất có thể liên kết vào đó. Ví dụ, các kháng thể TDB theo sáng chế có thể chứa chốt nằm trên nhánh kháng CD3 của nó và lỗ nằm trên nhánh hướng đích đến khối u của nó. Theo cách khác, các kháng thể TDB theo sáng chế có thể chứa chốt nằm trên nhánh hướng đích đến khối u của nó và lỗ nằm trên nhánh kháng CD3 của nó. Các kháng thể đa đặc hiệu cũng có thể được xử lý kỹ thuật bằng cách sử dụng công nghệ trao đổi chéo globulin miễn dịch (còn được gọi là dạng thức CrossMab hoặc trao đổi miền Fab) (ví dụ, xem tài liệu: WO2009/080253; Schaefer et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 108:11187-11192 (2011)). Cũng có thể tạo các kháng thể đa đặc hiệu bằng cách xử lý kỹ thuật hiệu ứng lái tĩnh điện dùng để tạo ra các phân tử dạng heterodime Fc của kháng thể (WO 2009/089004A1); liên kết ngang hai hoặc nhiều hơn hai kháng

thể hoặc mảnh kháng thể (ví dụ, xem tài liệu: Patent Mỹ số 4676980, và Brennan et al., *Science*, 229: 81 (1985)); bằng cách sử dụng khóa kéo leuxin để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, xem tài liệu: Kostelny et al., *J. Immunol.*, 148(5):1547-1553 (1992)); sử dụng công nghệ "kháng thể thể đôi" để tạo ra các mảnh kháng thể đặc hiệu kép (ví dụ, xem tài liệu: Hollinger et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, 90:6444-6448 (1993)); và sử dụng dime Fv chuỗi đơn (sFv) (ví dụ, xem tài liệu: Gruber et al., *J. Immunol.*, 152:5368 (1994)); và tạo ra các kháng thể ba đặc hiệu như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Tutt et al. *J. Immunol.* 147: 60 (1991).

f. Các biến thể kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein

Theo các phương án nhất định, có thể mong muốn là tạo ra được các kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein, ví dụ, "thioMAb", mà trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể này được thế bằng các gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc được thế này xuất hiện ở các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể. Bằng cách thay thế các gốc đó bằng xystein, các nhóm thiol có tính phản ứng theo đó được đặt ở các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để tiếp hợp kháng thể vào các gốc khác, như các gốc thuốc hoặc các gốc thuốc-tác nhân liên kết, để tạo ra thể tiếp hợp miễn dịch, như được mô tả thêm trong bản mô tả này. Theo các phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc dưới đây có thể được thế bằng xystein: V205 (cách đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (cách đánh số Châu Âu) của chuỗi nặng; và S400 (cách đánh số Châu Âu) của vùng Fc của chuỗi nặng. Các kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein có thể được tạo ra như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Patent Mỹ số 7521541, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

g. Các dẫn xuất kháng thể khác

Theo các phương án nhất định, kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, như kháng thể TDB theo sáng chế hoặc biến thể của nó) được đề cập đến trong bản mô tả này có thể được cải biến thêm để chứa các gốc không có protein phụ thêm mà đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này và dễ tìm. Các gốc thích hợp cho quá trình tạo dẫn xuất kháng thể bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở

các polyme tan được trong nước. Các ví dụ không giới hạn về các polyme tan được trong nước bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), các copolyme etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinylic, polyvinyl pyrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme etylen/anhydrit maleic, các axit polyamin (các homopolyme hoặc các copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrolidon)polyetylen glycol, các homopolyme propropylen glycol, các co-polyme prolypropylen oxit/etylen oxit, các polyol đã được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinylic, và các hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có nhiều ưu điểm trong sản xuất do độ ổn định của nó trong nước. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể có dạng mạch nhánh hoặc không nhánh. Số lượng polyme được gắn kết vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn kết, thì chúng có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Nhìn chung, số lượng polyme và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa vào các yếu tố cần cân nhắc bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các thuộc tính hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, cho dù dẫn xuất kháng thể có được sử dụng trong liệu pháp trong các điều kiện đã xác định, v.v. hay không.

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến các thể tiếp hợp của kháng thể và gốc không có protein mà có thể được gia nhiệt một cách chọn lọc bằng cách tiếp xúc với bức xạ. Theo một phương án, gốc không có protein là ống nano carbon (Kam et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 102: 11600-11605, 2005). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các bước sóng không gây hại cho các tế bào thông thường, nhưng gia nhiệt gốc không có protein đến nhiệt độ mà ở đó các tế bào gần với gốc không có protein-kháng thể bị tiêu diệt.

B. Các chế phẩm và các phương pháp tái tổ hợp

Các kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, các kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, như các kháng thể TDB theo sáng chế hoặc các biến thể của chúng) có thể được tạo ra bằng cách sử dụng các chế phẩm và các phương pháp tái tổ hợp, ví dụ, như được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 4816567. Theo một phương án, sáng chế đề

cập đến axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể kháng FcRH5 được mô tả trong bản mô tả này. Theo một phương án, tế bào chủ có nhân thực, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO). Theo một phương án, tế bào chủ có nhân sơ, ví dụ, tế bào *E. coli*. Theo một phương án, phương pháp tạo ra kháng thể kháng FcRH5 được đề cập đến, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ bao gồm axit nucleic mã hóa kháng thể này, như được đề cập ở trên, trong các điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể đó từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ). Theo một phương án khác, phương pháp này còn bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ thứ hai bao gồm axit nucleic thứ hai mã hóa kháng thể kháng CD3 gồm miền liên kết mà liên kết CD3. Theo một số phương án, các tế bào chủ được nuôi cấy đồng thời. Một phương án khác nữa bao gồm bước thu hồi kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép từ tế bào chủ hoặc môi trường nuôi cấy. Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 và kháng thể kháng CD3 được sản sinh trong cùng một tế bào chủ (ví dụ, phương pháp một tế bào). Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 và kháng thể kháng CD3 được sản sinh ra trong các tế bào chủ tách biệt (ví dụ, phương pháp hai tế bào).

Trong phương pháp một tế bào và phương pháp hai tế bào, một hoặc nhiều plasmit mã hóa FcRH5 TDB (ví dụ, kháng thể một nửa FcRH5 và kháng thể một nửa CD3) được đưa vào một hoặc nhiều tế bào chủ dùng cho quá trình nuôi cấy và biểu hiện TDB. Trong một trường hợp, một plasmit đơn lẻ có thể mã hóa cả kháng thể một nửa FcRH5 và kháng thể một nửa CD3. Theo cách khác, các kháng thể một nửa có thể được mã hóa bằng các plasmit tách biệt. Trong một trường hợp khác, chuỗi nặng của từng kháng thể một nửa được mã hóa trên plasmit thứ nhất, trong khi chuỗi nhẹ của từng kháng thể một nửa đó được mã hóa trên plasmit thứ hai. Trong phương pháp một tế bào, FcRH5 TDB được sản xuất trong một vật chủ đơn lẻ. Trong phương pháp hai tế bào, FcRH5 TDB được sản xuất bằng cách biểu hiện các kháng thể một nửa trong các vật chủ tách biệt (ví dụ, các môi trường nuôi cấy tách biệt có các tế bào chủ giống nhau, hoặc các môi trường nuôi cấy tách biệt có các tế bào chủ khác nhau). Trong phương pháp hai tế bào, hai vật chủ có thể được nuôi cấy trong cùng một bình hoặc trong các bình khác nhau. Hai môi trường nuôi cấy vật chủ này có thể được kết

hợp trước khi phân giải và tinh chế FcRH5 TDB hoặc hai kháng thể một nửa này có thể được tinh chế một cách tách biệt.

Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, như kháng thể FcRH5 TDB theo sáng chế) đã được cải biến để bao gồm các cải biến không đối xứng (ví dụ, các đột biến của các miền VH, VL, CH1, CL và/hoặc Fc được mô tả ở trên) được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp một tế bào, mà giúp cải thiện sự ghép cặp chuỗi nặng/chuỗi nhẹ chính xác và/hoặc cải thiện sản lượng kháng thể kháng FcRH5 so với kháng thể kháng FcRH5 chưa được cải biến để bao gồm các cải biến không đối xứng.

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện các vật truyền mã hóa kháng thể bao gồm tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân thực được mô tả trong bản mô tả này. Ví dụ, các kháng thể có thể được tạo ra ở vi khuẩn, đặc biệt là khi quá trình glycosyl hóa và chức năng tác động của Fc là không cần thiết. Đối với quá trình biểu hiện các mảnh kháng thể và các polypeptit ở vi khuẩn, ví dụ, xem tài liệu: các Patent Mỹ số 5648237, 5789199, và 5840523 (ví dụ, xem tài liệu: Charlton, *Methods in Molecular Biology, Vol. 248* (B.K.C. Lo, ed., Humana Press, Totowa, NJ, 2003), pp. 245-254, mô tả quá trình biểu hiện của các mảnh kháng thể ở *E. coli*). Sau khi biểu hiện, kháng thể này có thể được phân lập từ bột nhão tế bào vi khuẩn trong phần tan được và có thể được tinh chế thêm.

Ngoài các sinh vật nhân sơ ra, thì các vi sinh vật nhân thực như nấm sợi hoặc nấm men là các vật chủ tách dòng hoặc biểu hiện thích hợp cho các vật truyền mã hóa kháng thể, bao gồm các chủng nấm mốc và chủng nấm men có con đường glycosyl hóa đã "được biến đổi giống như của người", dẫn đến việc tạo ra kháng thể có mẫu hình glycosyl hóa ở người một phần hoặc đầy đủ. Xem tài liệu: Gerngross, *Nat. Biotech.* 22:1409-1414, 2004, và Li et al. *Nat. Biotech.* 24:210-215, 2006.

Các tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể được glycosyl hóa cũng được tạo ra 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 tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirut khác nhau đã được nhận diện mà có thể được

sử dụng chung với các tế bào côn trùng, cụ thể là để chuyển nhiễm các tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các giống cấy tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, xem tài liệu: các Patent Mỹ số 5959177, 6040498, 6420548, 7125978, và 6417429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ dùng để sản xuất các kháng thể ở các loài thực vật chuyển gen).

Các tế bào động vật có xương sống cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Ví dụ, các dòng tế bào động vật có vú mà được biến đổi thích ứng để phát triển trong huyền phù có thể là hữu ích. Các ví dụ khác về các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích là dòng CV1 ở thận khỉ được biến nạp bằng SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi thai của người (293 hoặc tế bào 293 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Graham *et al., J. Gen Virol.* 36:59, 1977); các tế bào thận chuột đồng sơ sinh (BHK); các tế bào Sertoli của chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Mather, *Biol. Reprod.* 23:243-251, 1980); các tế bào thận của khỉ (CV1); các tế bào thận của khỉ xanh Châu Phi (VERO-76); các tế bào ung thư biểu mô cổ tử cung của người (HELA); các tế bào thận của chó (MDCK; các tế bào gan của chuột buffalo (BRL 3A); các tế bào phổi của người (W138); các tế bào gan của người (Hep G2); khối u vú của chuột nhắt (MMT 060562); các tế bào TRI, như được mô tả, ví dụ, trong tài liệu: Mather *et al., Annals N.Y. Acad. Sci.* 383:44-68 1982; các tế bào MRC 5; và các tế bào FS4. Các dòng tế bào chủ của động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Quốc (CHO), bao gồm các tế bào DHFR- CHO (Urlaub *et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 77:4216, 1980); và các dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để tìm hiểu về một số dòng tế bào chủ của động vật có vú nhất định thích hợp cho quá trình sản xuất kháng thể, ví dụ, xem tài liệu: Yazaki et al. *Methods in Molecular Biology,* 248:255-268, 2003.

C. Các thử nghiệm

Các kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, các kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, như các kháng thể TDB theo sáng chế hoặc các biến thể của chúng) được đề cập đến trong bản mô tả này có thể được nhận diện, được sàng lọc, hoặc xác định đặc

điểm về các thuộc tính vật lý/hóa học và/hoặc các hoạt tính sinh học của chúng bằng các thử nghiệm khác nhau đã biết trong lĩnh vực kỹ thuật này.

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

Theo một khía cạnh, kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế được kiểm tra về hoạt tính liên kết kháng nguyên của nó, ví dụ, bằng các phương pháp đã biết như ELISA, phương pháp thấm tách phương Tây, v.v..

Theo một khía cạnh khác, các thử nghiệm cạnh tranh có thể được sử dụng để nhận diện kháng thể cạnh tranh với kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế để liên kết vào FcRH5.

Trong một thử nghiệm cạnh tranh làm ví dụ, FcRH5 bất động được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất mà liên kết vào FcRH5 và kháng thể không được đánh dấu thứ hai mà được kiểm tra về khả năng của nó trong việc cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết vào FcRH5. Kháng thể thứ hai có thể có mặt trong dịch nổi trên bề mặt tế bào lai. Trong vai trò là mẫu đối chứng, FcRH5 bất động được ủ trong dung dịch chứa kháng thể được đánh dấu thứ nhất nhưng không chứa kháng thể không được đánh dấu thứ hai. Sau khi ủ trong các điều kiện cho phép kháng thể thứ nhất liên kết vào FcRH5, thì lượng dư kháng thể không liên kết được loại bỏ, và lượng chất đánh dấu kết hợp với FcRH5 bất động được đo. Nếu lượng chất đánh dấu kết hợp với FcRH5 bất động trong mẫu thử nghiệm về cơ bản giảm về đi so với mẫu đối chứng, thì, điều đó cho thấy rằng kháng thể thứ hai đang cạnh tranh với kháng thể thứ nhất để liên kết vào FcRH5. Ví dụ, xem tài liệu: Harlow and Lane (1988) *Antibodies:A Laboratory Manual*. Ch.14 (Cold Spring Harbor Laboratory, Cold Spring Harbor, NY).

2. Các thử nghiệm hoạt tính

Theo một khía cạnh, các thử nghiệm được đưa ra nhằm nhận diện các kháng thể kháng FcRH5 của nó có hoạt tính sinh học. Hoạt tính sinh học có thể bao gồm, ví dụ, khả năng liên kết vào FcRH5, hoặc mảnh peptit của nó, hoặc *in vivo*, *in vitro*, hoặc *ex vivo*. Trong trường hợp kháng thể kháng FcRH5 đa đặc hiệu (ví dụ, đặc hiệu kép) theo sáng chế (ví dụ, kháng thể TDB có một nhánh kháng FcRH5 và một nhánh

nhận biết phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3), thì hoạt tính sinh học cũng có thể bao gồm, ví dụ, sự hoạt hóa tế bào tác động (ví dụ, sự hoạt hóa tế bào T (ví dụ, tế bào T CD8+ và/hoặc tế bào T CD4+)), sự phát triển quần thể tế bào tác động (tức là, sự gia tăng số lượng tế bào T), sự giảm quần thể tế bào đích (tức là, sự giảm quần thể các tế bào biểu hiện phân tử sinh học thứ hai trên các bề mặt tế bào của chúng), và/hoặc sự tiêu diệt tế bào đích. Các kháng thể có hoạt tính sinh học *in vivo* và/hoặc *in vitro* như vậy được đề xuất. Theo các phương án nhất định, kháng thể theo sáng chế được kiểm tra về hoạt tính sinh học đó, như được mô tả chi tiết ở phần Ví dụ thực hiện sáng chế dưới đây trong bản mô tả này.

Theo một số phương án, hoạt tính kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB) bao gồm khả năng hỗ trợ quá trình tiêu diệt tế bào B và/hoặc quá trình hoạt hóa các tế bào T gây độc tế bào. Theo các phương án nhất định, kháng thể FcRH5 TDB theo sáng chế được kiểm tra về khả năng tiêu diệt tế bào B này và/hoặc khả năng hoạt hóa tác dụng gây độc tế bào do hoạt tính sinh học của các tế bào T bằng phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này, cụ thể là trong phần Ví dụ thực hiện sáng chế. Theo một số phương án về thử nghiệm bất kỳ trong số các thử nghiệm hoạt tính này, PBMC có thể được phân lập từ máu toàn phần của đối tượng cho khỏe mạnh bằng phương pháp tách Ficoll. Cụ thể, máu của người có thể được thu gom trong bơm tiêm được phủ heparin, và PBMC được phân lập bằng cách sử dụng phương pháp tách Leucosep và Ficoll Paque Plus. Nếu cần thiết, tế bào T CD4+ và tế bào T CD8+ có thể được tách bằng các bộ kit Miltenyi theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Ngoài ra, các tế bào có thể được rửa trong môi trường RPMI chứa FBS 10%, có bổ sung GlutaMax, penixilin & streptomyxin, và ~0,2 triệu tế bào được tạo huyền phù được bổ sung vào đĩa 96 lỗ có đáy hình chữ U. Các tế bào có thể được nuôi cấy trong RPMI1640 có bổ sung FBS 10% ở 37°C trong thiết bị ủ nuôi cấy tế bào tiêu chuẩn đã được làm ẩm. Đối với thử nghiệm tiêu diệt tế bào BJAB, 20.000 tế bào BJAB có thể được ủ với các tế bào tác động, dưới dạng các huPBMC hoặc dưới dạng các tế bào T được tinh chế, theo các tỷ lệ được chỉ định cho mỗi thử nghiệm, với sự có mặt của kháng thể TDB với các nồng độ khác nhau trong 24 giờ. Đối với các thử

nghiệm tiêu diệt tế bào B nội sinh, 200.000 huPBMC có thể được ủ với các nồng độ khác nhau của các kháng thể TDB trong 24 giờ.

Sau khi nuôi cấy, các tế bào có thể được rửa bằng dung dịch đệm FACS (BSA 0,5%, Na Azit 0,05% trong PBS). Sau đó, các tế bào này có thể được nhuộm trong dung dịch đệm FACS, được rửa bằng dung dịch đệm FACS và được tạo huyền phù trong 100µl dung dịch đệm FACS chứa 1µg/ml Propidi Iodua. Dữ liệu có thể được thu thập trên thiết bị đếm tế bào theo dòng chảy FACSCalibur và được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm FlowJo. Các tế bào B sống có thể được cho ra khỏi cổng ở dạng tế bào B CD19+ âm tính với PI hoặc tế bào B CD20+ âm tính với PI bằng FACS, và số tế bào tuyệt đối có thể thu được với các hạt FITC được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng trong vai trò là đối chứng đếm nội bội. Phần trăm (%)mức tiêu diệt tế bào có thể được tính toán dựa vào các đối chứng không được điều trị bằng TDB. Các tế bào T đã được hoạt hóa có thể được phát hiện ra thông qua sự biểu hiện trên bề mặt của CD25 và CD69 bằng cách sử dụng kháng thể kháng CD69-FITC và kháng thể kháng CD25-PE.

D. Thể tiếp hợp miễn dịch

Sáng chế còn đề cập đến các thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng FcRH5, ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 đa đặc hiệu, ví dụ, FcRH5 TDB được mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp vào một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như các loại thuốc hoặc các chất hóa trị, các chất ức chế sinh trưởng, các độc tố (ví dụ, các độc tố protein, các độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các đoạn của chúng), hoặc các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ.

Theo một phương án, thể tiếp hợp miễn dịch là thể tiếp hợp kháng thể-thuốc (antibody-drug conjugate-ADC) trong đó kháng thể được tiếp hợp vào một hoặc nhiều loại thuốc, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở maytansinoit (xem các Patent Mỹ số 5208020, 5416064 và Patent Châu Âu số EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc thuốc monometylauristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem các Patent Mỹ số 5635483 và 5780588, và 7498298); dolastatin; calicheamixin hoặc dẫn xuất của chúng (xem các Patent Mỹ số 5712374, 5714586, 5739116, 5767285, 5770701,

5770710, 5773001, và 5877296; Hinman et al. *Cancer Res.* 53:3336-3342, 1993; và Lode et al. *Cancer Res.* 58:2925-2928, 1998); antraxyclin như daunomyxin hoặc doxorubixin (xem các tài liệu Kratz et al. *Current Med. Chem.* 13:477-523, 2006; Jeffrey et al. *Bioorganic & Med. Chem. Letters* 16:358-362, 2006; Torgov et al. *Bioconj. Chem.* 16:717-721, 2005; Nagy et al. *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97:829-834, 2000; Dubowchik et al. *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12:1529-1532, 2002; King et al. *J. Med. Chem.* 45:4336-4343, 2002; và Patent Mỹ số 6630579); metotrexat; vindesin; taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothexen; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 đa đặc hiệu, ví dụ, FcRH5 TDB) được mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp vào một độc tố có hoạt tính enzym hoặc đoạn của nó, bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở chuỗi bạch hầu A, các đoạn có hoạt tính không liên kết của độc tố bạch hầu, chuỗi ngoại độc tố A (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi rixin A, chuỗi abrin A, chuỗi modexin A, alpha-sarcin, các protein Aleurites fordii, các protein dianthin, các protein thương lục Mỹ (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế mướp đắng, curxin, crotin, chất ức chế tạo phì thảo, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và tricothexen.

Theo một phương án khác, thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 đa đặc hiệu, ví dụ, FcRH5 TDB) được mô tả trong bản mô tả này được tiếp hợp vào nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để tạo thành thể tiếp hợp phóng xạ. Một loạt chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ là sẵn có để dùng cho việc sản xuất các thể tiếp hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211}, I^{131}, I^{125}, Y^{90}, Re^{186}, Re^{188}, Sm^{153}, Bi^{212}, P^{32}, Pb^{212} và các chất đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu. Khi thể tiếp hợp phóng xạ được sử dụng cho việc phát hiện, nó có thể bao gồm nguyên tử có hoạt tính phóng xạ dùng cho các nghiên cứu xạ hình, ví dụ, tc99m hoặc I123, hoặc chất đánh dấu quay dùng cho phương pháp chụp cộng hưởng từ hạt nhân (NMR) (còn được gọi là chụp cộng hưởng từ, mri), như lại iot-123, iot-131, indi-111, flo-19, carbon-13, nitơ-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Có thể tạo ra các thể tiếp hợp của kháng thể và chất gây độc tế bào bằng cách sử dụng một loạt chất liên hợp protein hai chức năng như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimitmetyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), các dẫn xuất hai chức năng của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), các este có hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), các aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexandiamin), các dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), các dạng diisoxyanat (như toluen 2,6-diisoxyanat), và các hợp chất flo có hoạt tính bis (như 1,5-diflo-2,4-dinitrobenzen). Ví dụ, độc tố miễn dịch rixin có thể được điều chế như được mô tả trong tài liệu: Vitetta et al., *Science* 238:1098, 1987. Axit 1-isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triaminpentaaxetic được đánh dấu carbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat làm ví dụ để tiếp hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem Công bố đơn quốc tế số WO94/11026. Tác nhân liên kết có thể là "tác nhân liên kết có thể phân cắt được" tạo thuận lợi cho quá trình giải phóng thuốc gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, có thể sử dụng tác nhân liên kết không bền với axit, tác nhân liên kết nhạy cảm với peptidaza, tác nhân liên kết không bền với ánh sáng, tác nhân liên kết dimetyl hoặc tác nhân liên kết chứa disulfua (Chari et al., *Cancer Res.* 52:127-131, 1992; Patent Mỹ số 5208020).

Các thể tiếp hợp miễn dịch hay ADC trong bản mô tả này được dự định rõ ràng, nhưng không bị giới hạn ở, các thể tiếp hợp được điều chế bằng các chất phản ứng liên kết ngang bao gồm, nhưng không bị 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 (sucxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) mà các chất này sẵn có trên thị trường (ví dụ, từ hãng Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., Mỹ).

E. Dạng dược phẩm

Các dạng dược phẩm của kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, ví dụ, FcRH5 TDB) được bào chế bằng cách trộn kháng thể có mức độ tinh khiết mong muốn như vậy với một hoặc nhiều chất mang dược dụng

tùy ý, dung dịch đệm, chất làm ổn định, và/hoặc chất bảo quản (*Remington's Pharmaceutical Sciences* 16th edition, Osol, A. Ed. (1980)), dưới dạng chế phẩm đông khô hoặc các dung dịch chứa nước. Các chất mang dược dụng nhìn chung là không độc hại đối với đối tượng tiếp nhận ở các liều lượng và nồng độ được sử dụng, và bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở: các dung dịch đệm như phosphat, xitrat, và các axit hữu cơ khác; các chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và metionin; các chất bảo quản (như octadexyldimetylbenzyl amoni clorua; hexametoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; rượu benzyl, phenol hoặc butyl; các alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); các polypeptit có phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); các protein, như albumin huyết thanh, gelatin, hoặc các globulin miễn dịch; các polyme ưa nước như polyvinylpyrolidon; các axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin, hoặc lysin; các monosacarit, disacarit, và các carbohydrat khác bao gồm glucoza, manoza, hoặc các dextrin; các chất tạo chelat như EDTA; các loại đường như sucroza, manitol, trehaloza hoặc sorbitol; các ion đối tạo muối như natri; các phức chất kim loại (ví dụ, các phức chất Zn-protein); và/hoặc các chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang dược dụng làm ví dụ trong bản mô tả này còn bao gồm các chất phân tán thuốc kẽ như các glycoprotein hyaluronidaza dễ tan có hoạt tính trung tính (sHASEGP), ví dụ, các glycoprotein hyaluronidaza PH-20 tan được của người, như rHuPH20 (HYLENEX®, Baxter International, Inc.). Một số sHASEGP làm ví dụ nhất định và các phương pháp sử dụng, bao gồm rHuPH20, được mô tả trong tài liệu: các Công bố Đơn Patent Mỹ số 2005/0260186 và 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza phụ thêm như chondroitinaza.

Các dạng chế phẩm kháng thể đông khô làm ví dụ được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 6267958. Các dạng chế phẩm kháng thể chứa nước bao gồm những loại được mô tả trong tài liệu: Patent Mỹ số 6171586 và WO2006/044908, các dạng chế phẩm sau bao gồm dung dịch đệm histidin-axetat.

Dạng chế phẩm trong bản mô tả này có thể còn chứa nhiều thành phần hoạt tính khi cần thiết cho chỉ định cụ thể đang được điều trị, tốt hơn nếu những hợp chất

này có các hoạt tính bổ trợ mà không gây ảnh hưởng bất lợi cho nhau. Ví dụ, có thể mong muốn là được cung cấp thêm chất trị liệu phụ thêm (ví dụ, chất hóa trị, chất gây độc tế bào, chất ức chế sinh trưởng, và/hoặc chất kháng hormon, như những loại được liệt kê ở trên trong bản mô tả này). Các thành phần hoạt tính như vậy có mặt một cách phù hợp dưới dạng kết hợp với lượng hữu hiệu đối với mục đích được dự định.

Các thành phần hoạt tính có thể được giữ trong các viên vi nang được bào chế, ví dụ, bằng các kỹ thuật tụ giọt hoặc bằng phương pháp polyme hóa bề mặt, ví dụ, lần lượt đối với các viên vi nang hydroxymetylxenluloza hoặc gelatin và các viên vi nang poly-(metylmethacylat), trong các hệ phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, các hạt liposom, các vi cầu albumin, thể vi nhũ tương, các hạt nano và các viên nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật như vậy được bộc lộ trong tài liệu: *Remington's Pharmaceutical Sciences*16th edition, Osol, A. Ed. (1980).

Trong một số trường hợp, chế phẩm có thể bao gồm chất đối kháng liên kết trục PD-1 và/hoặc chất trị liệu phụ thêm. Ví dụ, chất đối kháng liên kết trục PD-1 có thể được chọn từ nhóm gồm MPDL3280A (atezolizumab), YW243.55.S70, MDX-1105, MEDI473 (durvalumab), và MSB0010718C (avelumab), MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), CT-011 (pidilizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810, và BGB-108. Ngoài ra, chế phẩm bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, FcRH5 TDB) có thể bao gồm steroit, chất điều biến miễn dịch (IMiD), chất ức chế proteosom (PI), hoặc dạng kết hợp của chúng.

Có thể điều chế các chế phẩm giải phóng chậm. Các ví dụ thích hợp về chế phẩm giải phóng chậm bao gồm các cơ chất bán thấm của các polyme kỵ nước dạng rắn chứa kháng thể này, trong đó các cơ chất này là ở dạng vật dụng được tạo hình, ví dụ, màng, hoặc viên vi nang.

Nhìn chung, các dạng chế phẩm sẽ được sử dụng cho phương thức dùng *in vivo* là vô trùng. Có thể dễ dàng thực hiện việc vô trùng này, ví dụ, bằng cách lọc qua các màng lọc vô trùng.

F. Các chế phẩm và phương pháp trị liệu

Kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế (ví dụ, các kháng thể kháng FcRH5 đặc hiệu kép theo sáng chế mà liên kết vào FcRH5 và phân tử sinh học thứ hai, ví dụ, CD3, ví dụ, FcRH5 TDB) có thể được sử dụng trong các phương pháp trị liệu.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 để sử dụng làm dược phẩm. Theo các khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 để sử dụng để điều trị hoặc trì hoãn sự tiến triển của rối loạn tăng sinh tế bào (ví dụ, bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, đa u tủy (MM)) và/hoặc tăng cường chức năng miễn dịch ở cá thể. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 để sử dụng trong phương pháp điều trị cho cá thể có rối loạn tăng sinh tế bào (ví dụ, bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, MM)) bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FcRH5. Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu phụ thêm, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Theo các phương án khác nữa, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 để sử dụng nhằm tăng cường chức năng miễn dịch ở cá thể có rối loạn tăng sinh tế bào, như bệnh ung thư dương tính với FcRH5 (ví dụ, MM). Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 để sử dụng trong phương pháp tăng cường chức năng miễn dịch ở cá thể có rối loạn tăng sinh tế bào bao gồm việc cho cá thể này dùng một lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FcRH5 để hoạt hóa các tế bào tác động (ví dụ, các tế bào T, ví dụ, tế bào T CD8+ và/hoặc tế bào T CD4+) có khả năng tạo ra tác dụng gây độc tế bào và/hoặc tác dụng gây chết tế bào theo chương trình đối với các tế bào đích (ví dụ, tế bào biểu hiện phân tử sinh học thứ hai được nhận biết bởi kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế, như kháng thể FcRH5 TDB theo sáng chế) ở cá thể đó. Kháng thể kháng FcRH5 có thể liên kết vào cả phân tử FcRH5 nằm trên tế bào đích và phân tử CD3 nằm trên tế bào tác động miễn dịch. Tế bào đích có thể là tương bào, như tương bào có thời gian sống ngắn hoặc tương

bào có thời gian sống dài. Ngoài ra, tế bào đích có thể là tế bào u tủy. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây có thể là con người.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến cách sử dụng kháng thể kháng FcRH5 trong sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này dùng để điều trị rối loạn tăng sinh tế bào (ví dụ, bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, MM)). Theo một phương án khác nữa, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp điều trị rối loạn tăng sinh tế bào bao gồm việc cho cá thể có rối loạn tăng sinh tế bào này dùng một lượng hữu hiệu của thuốc đó. Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu phụ thêm, ví dụ, như được mô tả dưới đây.

Theo một phương án khác nữa, thuốc này dùng để hoạt hóa các tế bào tác động (ví dụ, các tế bào T, ví dụ, tế bào T CD8+ và/hoặc tế bào T CD4+) có khả năng tạo ra tác dụng gây độc tế bào và/hoặc tác dụng gây chết tế bào theo chương trình đối với các tế bào đích (ví dụ, tế bào biểu hiện phân tử sinh học thứ hai được nhận biết bởi kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế, như kháng thể FcRH5 TDB theo sáng chế) ở cá thể. Theo một phương án khác nữa, thuốc này là để sử dụng trong phương pháp tăng cường chức năng miễn dịch ở cá thể có rối loạn tăng sinh tế bào bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của thuốc để hoạt hóa các tế bào tác động (ví dụ, các tế bào T, ví dụ, tế bào T CD8+ và/hoặc tế bào T CD4+), phát triển (làm tăng) quần thể tế bào tác động, làm giảm quần thể tế bào đích (ví dụ, tế bào biểu hiện phân tử sinh học thứ hai được nhận biết bởi kháng thể kháng FcRH5 theo sáng chế, như kháng thể FcRH5 TDB theo sáng chế), và/hoặc tiêu diệt tế bào đích (ví dụ, tế bào khối u đích). "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây có thể là con người.

Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp dùng để điều trị rối loạn tăng sinh tế bào (ví dụ, bệnh ung thư). Bệnh ung thư dương tính với FcRH5 này có thể là bệnh ung thư tế bào B. Trong một số trường hợp, bệnh ung thư tế bào B này có thể là đa u tủy (MM), bệnh bạch cầu dạng bạch huyết mạn tính (CLL), u bạch huyết tế bào áo nang (MCL), u bạch huyết tế bào B lớn lan tỏa (DLBCL), và/hoặc u bạch huyết thể nang (FL). Trong các trường hợp cụ thể, bệnh ung thư tế

bào B này là MM. Trong các trường hợp khác, bệnh ung thư dương tính với FcRH5 này là ung thư tế bào B. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm việc cho cá thể có rối loạn tăng sinh tế bào như vậy (ví dụ, bệnh ung thư, ví dụ, ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, đa u tủy (MM)) dùng lượng hữu hiệu của kháng thể kháng FcRH5. Theo một phương án như vậy, phương pháp này còn bao gồm việc cho cá thể này dùng lượng hữu hiệu của ít nhất một chất trị liệu phụ thêm, ví dụ, như được mô tả dưới đây. "Cá thể" theo phương án bất kỳ trong số các phương án trên đây có thể là con người.

Có thể sử dụng các kháng thể theo sáng chế chỉ một mình hoặc ở dạng kết hợp với các chất khác trong liệu pháp. Ví dụ, kháng thể theo sáng chế có thể được cho dùng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu phụ thêm. Theo các phương án nhất định, chất trị liệu phụ thêm là chất đối kháng liên kết trục PD-1 như MPDL3280A (atezolizumab), YW243.55.S70, MDX-1105, MEDI473 (durvalumab), và MSB0010718C (avelumab), MDX 1106 (nivolumab), MK-3475 (pembrolizumab), CT-011 (pidilizumab), MEDI-0680 (AMP-514), PDR001, REGN2810, và/hoặc BGB-108. Ngoài ra, cũng có thể cho đối tượng dùng steroit, chất điều biến miễn dịch (IMiD), chất ức chế proteosom (PI), hoặc dạng kết hợp của chúng. Theo một phương án, glucocorticoit này là dexametason. Theo một số phương án, IMiD này là lenalidomit. Theo một số phương án, PI này là bortezomib.

Các liệu pháp kết hợp được nêu ở trên như vậy bao gồm phương thức dùng kết hợp (trong đó hai chất trị liệu trở lên được bao gồm trong cùng một dạng chế phẩm hoặc các dạng chế phẩm tách biệt), và phương thức dùng tách biệt, mà trong trường hợp này, việc dùng kháng thể theo sáng chế có thể diễn ra trước, đồng thời, và/hoặc sau khi dùng chất trị liệu phụ thêm hoặc các chất trị liệu phụ thêm. Theo một phương án, việc dùng kháng thể kháng FcRH5 và việc dùng chất trị liệu phụ thêm diễn ra trong vòng một tháng, hoặc trong vòng một, hai hoặc ba tuần, hoặc trong vòng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày, cách nhau.

Kháng thể theo sáng chế (và/hoặc chất trị liệu phụ thêm bất kỳ) có thể được cho dùng bằng phương tiện thích hợp bất kỳ, bao gồm dùng trong tĩnh mạch, dưới da, trong cơ, khu trú, qua đường miệng, qua da, trong màng bụng, trong hốc mắt,

bằng cách cấy ghép, bằng phương pháp xông hít, trong khoang dịch não tủy, trong não thất, hoặc trong mũi. Việc dùng theo liều lượng có thể là qua đường dùng thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm, như tiêm trong tĩnh mạch hoặc dưới da, tùy thuộc một phần vào việc dùng thuốc là trong thời gian ngắn hay liên tục trong khoảng thời gian dài. Nhiều lịch biểu dùng thuốc khác nhau bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, dùng một liều duy nhất hoặc nhiều liều vào các thời điểm khác nhau, dùng liều bolus, và truyền theo xung được bao gồm trong bản mô tả này.

Các kháng thể theo sáng chế sẽ được phối trộn, định liều, và cho dùng theo phương thức phù hợp với tiêu chuẩn thực hành khám chữa bệnh tốt dành cho bác sĩ. Các yếu tố để cân nhắc trong phạm vi bối cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể đang được điều trị, động vật có vú cụ thể đang được điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây rối loạn, vị trí phân phối chất điều trị, phương pháp dùng thuốc, lịch biểu dùng thuốc, và các yếu tố khác đã biết đối với những người thực hành y khoa. Kháng thể này không cần phải, nhưng tùy ý được phối trộn cùng với một hoặc nhiều chất hiện được sử dụng để phòng ngừa hoặc điều trị rối loạn đang quan tâm. Lượng hữu hiệu của các chất khác này tùy thuộc vào lượng kháng thể có mặt trong dạng chế phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác được bàn luận ở trên. Nhìn chung, những chất này được sử dụng ở cùng liều lượng và bằng các đường dùng như được mô tả trong bản mô tả này, hoặc khoảng từ 1% đến 99% liều lượng được mô tả trong bản mô tả này, hoặc với liều lượng bất kỳ và bằng đường dùng bất kỳ đã được xác định theo kinh nghiệm/lâm sàng là thích hợp.

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh (ví dụ, rối loạn tế bào tăng sinh, ví dụ, bệnh ung thư, ví dụ, ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, MM)), liều lượng thích hợp của kháng thể theo sáng chế (khi được sử dụng một mình hoặc ở dạng kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu phụ thêm khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần được điều trị, loại kháng thể, mức độ trầm trọng và tiến trình của bệnh, dù kháng thể đó được cho dùng nhằm mục đích phòng ngừa hay trị liệu, liệu pháp trước đó, tiền sử lâm sàng của bệnh nhân và mức đáp ứng với kháng thể, và sự thận trọng của bác sĩ điều trị. Cho bệnh nhân dùng kháng thể này theo cách thích hợp với một lần điều trị hoặc nhiều lần điều trị khác nhau.

Theo đề xuất chung, lượng hữu hiệu về mặt trị liệu của kháng thể kháng FcRH5 được dùng cho người sẽ nằm trong khoảng từ 0,01 đến 100mg/kg thể trọng bệnh nhân dù là một hay nhiều lần dùng thuốc. Ví dụ, theo một số phương án, kháng thể được sử dụng là khoảng từ 0,01 đến 55mg/kg, 50mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 45mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 40mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 35mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 30mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 25mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 20mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 15mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 10mg/kg, khoảng từ 0,01 đến 5mg/kg, hoặc khoảng từ 0,01 đến 1mg/kg được dùng hằng ngày. Theo một phương án, cho người dùng kháng thể kháng FcRH5 được mô tả trong bản mô tả này ở liều lượng là khoảng 100mg, khoảng 200mg, khoảng 300mg, khoảng 400mg, khoảng 500mg, khoảng 600mg, khoảng 700mg, khoảng 800mg, khoảng 900mg, khoảng 1000mg, khoảng 1100mg, khoảng 1200mg, khoảng 1300mg hoặc khoảng 1400mg vào ngày 1 trong chu kỳ 21 ngày. Liều lượng này có thể được cho dùng dưới dạng liều duy nhất hoặc dưới dạng nhiều liều dùng (ví dụ, 2 hoặc 3 liều dùng), như các liều lượng truyền. Đối với phương thức dùng lặp lại trong khoảng một vài ngày hoặc lâu hơn, thì tùy thuộc vào tình trạng bệnh, nhìn chung việc điều trị sẽ được duy trì cho đến khi ức chế được các triệu chứng bệnh theo ý muốn. Một liều lượng làm ví dụ của kháng thể thường nằm trong khoảng từ 0,05mg/kg đến 10mg/kg. Vì vậy, có thể cho bệnh nhân dùng một hoặc nhiều liều lượng trong số khoảng 0,5mg/kg, 2,0mg/kg, 4,0mg/kg, hoặc 10mg/kg (hoặc dạng kết hợp bất kỳ của các khoảng này). Theo một số phương án, kháng thể kháng FcRH5 được cho dùng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,01mg/kg/tuần đến 10mg/kg/tuần. Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 được cho dùng ở liều lượng nằm trong khoảng từ 0,1mg/kg/tuần đến 10mg/kg/tuần. Theo các phương án khác, kháng thể kháng FcRH5 được cho dùng ở liều lượng là khoảng 1mg/kg/tuần.

Các liều lượng như vậy có thể được cho dùng theo kiểu ngắt quãng, ví dụ, mỗi tuần một lần hoặc ba tuần một lần (ví dụ, sao cho bệnh nhân tiếp nhận khoảng từ hai đến hai mươi, hoặc, ví dụ, khoảng sáu liều lượng của kháng thể kháng FcRH5). Có thể cho dùng liều nạp ban đầu cao hơn, sau đó là một hoặc nhiều liều lượng thấp hơn. Sự tiến triển của liệu pháp này được theo dõi một cách dễ dàng bằng các kỹ thuật và các thử nghiệm thông thường.

Theo một số phương án, các phương pháp này có thể còn bao gồm liệu pháp phụ thêm. Liệu pháp phụ thêm này có thể là liệu pháp phóng xạ, phẫu thuật, liệu pháp hóa học, liệu pháp gen, liệu pháp ADN, liệu pháp virut, liệu pháp ARN, liệu pháp miễn dịch, liệu pháp cấy ghép tủy xương, liệu pháp nano, liệu pháp kháng thể đơn dòng, hoặc dạng kết hợp của các liệu pháp trên đây. Liệu pháp phụ thêm này có thể là dưới dạng hỗ trợ trị liệu hoặc hỗ trợ tiền trị liệu. Theo một số phương án, liệu pháp phụ thêm này là phương thức dùng chất ức chế enzym phân tử nhỏ hoặc chất chống di căn. Theo một số phương án, liệu pháp phụ thêm này là phương thức dùng các chất hạn chế tác dụng phụ (ví dụ, các chất được dự định để làm giảm sự xuất hiện và/hoặc mức độ trầm trọng của các tác dụng phụ do điều trị, như các chất chống buồn nôn, v.v.). Theo một số phương án, liệu pháp phụ thêm này là liệu pháp phóng xạ. Theo một số phương án, liệu pháp phụ thêm này là phẫu thuật. Theo một số phương án, liệu pháp phụ thêm này là dạng kết hợp của liệu pháp phóng xạ và phẫu thuật. Theo một số phương án, liệu pháp phụ thêm này là phương pháp chiếu xạ gama. Theo một số phương án, liệu pháp phụ thêm này có thể là phương thức dùng tách biệt một hoặc nhiều chất trị liệu được mô tả ở trên.

G. 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 FcRH5 theo sáng chế là hữu ích trong việc phát hiện sự có mặt của FcRH5 trong mẫu sinh phẩm. Thuật ngữ "phát hiện" như được sử dụng trong bản mô tả này bao gồm sự phát hiện định tính hoặc định lượng. Theo các phương án nhất định, mẫu sinh phẩm bao gồm tế bào hoặc mô.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể kháng FcRH5 để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện. Theo một khía cạnh khác nữa, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của FcRH5 có trong tự nhiên ở mẫu sinh phẩm. Theo các phương án nhất định, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh phẩm này tiếp xúc với kháng thể kháng FcRH5 như được mô tả trong bản mô tả này trong các điều kiện cho phép kháng thể kháng FcRH5 này liên kết vào FcRH5 có trong tự nhiên, và phát hiện xem liệu phức hợp có được tạo ra giữa kháng thể kháng FcRH5 đó và FcRH5 có trong tự nhiên hay không. Phương pháp như vậy có

thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*. Trong một số trường hợp, mẫu sinh phẩm này là mẫu máu. Trong một số trường hợp, đối tượng này là con người.

Theo các phương án nhất định, sáng chế đề cập đến các kháng thể kháng FcRH5 được đánh dấu. Các chất đánh dấu bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chất đánh dấu hoặc các gốc mà được phát hiện một cách trực tiếp (như các chất đánh dấu huỳnh quang, có nhóm mang màu, dày đặc điện tử, phát quang hóa học, và có hoạt tính phóng xạ), cũng như các gốc, như các enzym hoặc các phối tử, mà được phát hiện một cách gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu làm ví dụ bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, các chất đồng vị phóng xạ ^{32}P, ^{14}C, ^{125}I, ^{3}H, và ^{131}I, các chất phát huỳnh quang như các chất tạo chelat đất hiếm hoặc florexein và các dẫn xuất của nó, rodamin và các dẫn xuất của nó, dansyl, umbelliferon, các luxeriferaza, ví dụ, luxiferaza của đom đóm và luxiferaza của vi khuẩn (Patent Mỹ số 4737456), luxiferin, 2,3-dihydrophtalazindion, peroxidaza của cây cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, β-galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, các dạng sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza, và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, oxidaza dị vòng như uricaza và xantin oxidaza, được liên hợp với enzym mà sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza, hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, các chất đánh dấu quay, các chất đánh dấu thể thực khuẩn, các gốc tự do ổn định, và các chất tương tự.

H. Các vật dụng sản xuất

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến vật dụng sản xuất chứa các vật liệu hữu ích cho việc điều trị, phòng ngừa, và/hoặc chẩn đoán các rối loạn tế bào tăng sinh (ví dụ, bệnh ung thư, ví dụ, bệnh ung thư dương tính với FcRH5, ví dụ, đa u tủy (MM)) ở đối tượng (ví dụ, con người). Vật dụng sản xuất bao gồm vật chứa và nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng ở trên vật chứa hoặc đi kèm với vật chứa đó. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, bơm tiêm, túi dung dịch IV, v.v.. Vật chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc nhựa. Vật chứa chứa đựng chế phẩm mà ở dạng chỉ một mình hoặc được kết hợp với một chế phẩm khác hữu hiệu cho việc điều trị, phòng ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh và có thể có

cổng tiếp cận vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi chứa dung dịch tiêm tĩnh mạch hoặc lọ nhỏ có một nút chặn có thể đâm xuyên được bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm này là kháng thể theo sáng chế. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm này được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh được chọn. Hơn nữa, vật dụng sản xuất có thể bao gồm (a) vật chứa thứ nhất có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm này bao gồm kháng thể theo sáng chế; và (b) vật chứa thứ hai có chế phẩm được chứa trong đó, trong đó chế phẩm này bao gồm chất gây độc tế bào khác nữa hoặc chất trị liệu khác nữa. Vật dụng sản xuất theo phương án này của sáng chế còn có thể bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng các chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị một tình trạng bệnh lý cụ thể. Ngoài ra hoặc theo cách khác, vật dụng sản xuất còn có thể bao gồm vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa dung dịch đệm dược dụng, như nước kìm hãm vi khuẩn dùng để tiêm (bacteriostatic water for injection-BWFI), dung dịch muối được đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch đextroza. Vật dụng sản xuất còn có thể bao gồm cả các vật liệu khác thích hợp theo quan điểm thương mại và người sử dụng, bao gồm các dung dịch đệm khác, chất pha loãng, bộ lọc, kim tiêm và bơm tiêm. Trong một số trường hợp, bộ kit bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng bao gồm các hướng dẫn về cách sử dụng kháng thể để điều trị hoặc trì hoãn sự tiến triển của bệnh ung thư dương tính với FcRH5 (ví dụ, MM) ở đối tượng. Trong các trường hợp khác, bộ kit bao gồm tờ hướng dẫn sử dụng bao gồm các hướng dẫn về cách sử dụng kháng thể để tăng cường chức năng miễn dịch ở đối tượng có bệnh ung thư dương tính với FcRH5 (ví dụ, MM).

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ về các phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Cần phải hiểu rằng nhiều phương án đa dạng khác có thể được thực hiện, tạo nên phần mô tả tổng quát được đề cập đến trên đây.

Ví dụ 1. Tạo ra các kháng thể kháng FcRH5

Gây miễn dịch và sàng lọc

Các con chuột nhắt BALB/c (Charles River, Hollister, CA) được gây miễn dịch bằng 2µg, 10µg, hoặc 100µg/liều tiêm cho mỗi con. Các kháng nguyên được

tạo huyền phù trong chất phụ trợ monophosphoryl lipit A (MPL)/trehaloza dicorynomycolat (TDM) (Ribi) hoặc chất phụ trợ Freund và được tiêm vào gan bàn chân, màng bụng, hoặc phần gốc đuôi của mỗi con chuột được gây miễn dịch. Các con chuột nhắt đã tiếp nhận tổng cộng 9 đến 18 liều lượng và 1 đến 2 liều tiêm nhắc lại trước dung hợp trong một mình PBS thông qua gan bàn chân, trong màng bụng (IP), và/hoặc đường khớp cổ chân từ 2 đến 4 ngày trước khi dung hợp. Chiến dịch gây miễn dịch A, được mô tả trong tài liệu: Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2015/0098900, đã tạo ra kháng thể mẹ kháng FcRH5 1G7 mà được tối ưu hóa và xác định đặc điểm thêm trong bản mô tả này.

A. Chiến dịch gây miễn dịch B

Để tạo ra các kháng thể đặc hiệu với dạng đồng đẳng dùng cho miền Ig gần màng của FcRH5, thì các con chuột nhắt được gây miễn dịch bằng protein E11 (các axit amin 745-850 của SEQ ID NO: 114) có đuôi biểu hiện His đầu tận cùng N mà được biểu hiện ở các tế bào CHO. Năm con chuột nhắt được gây miễn dịch bằng 10µg protein E11 được gắn đuôi His trong chất phụ trợ Ribi thông qua đường dùng IP. Các con này tiếp nhận 18 liều lượng, sau đó là hai liều tiêm nhắc lại trước dung hợp trong một mình PBS thông qua đường dùng IP bảy và bốn ngày trước khi dung hợp. Sau 18 liều lượng của protein E11 tái tổ hợp, huyết thanh được phân tích về các kháng thể liên kết FcRH5 bằng cách sử dụng FACS và bằng phương pháp chuẩn độ trong ELISA bằng cách sử dụng E11 làm kháng nguyên. Đã phát hiện thấy tính phản ứng đáng kể đối với các tế bào SVT2 mà biểu hiện FcRH5 có chiều dài đầy đủ của người, FcRH5 có chiều dài đầy đủ của khỉ cyno, hoặc protein E11, nhưng không phát hiện ra đối với các tế bào SVT2 được chuyển nhiễm bằng vật truyền, chỉ báo rằng các kháng thể liên kết FcRH5 đã có mặt trong huyết thanh của tất cả năm con chuột nhắt được gây miễn dịch. Sau 20 liều lượng, bạch huyết bào từ các con chuột nhắt đã được gây miễn dịch được dung hợp bằng điện với các tế bào u tủy của chuột nhắt là P3X63Ag8U.1.22.

Các dòng vô tính được kiểm tra về khả năng liên kết vào protein E11 tái tổ hợp của người và protein E11 tái tổ hợp của khỉ cyno bằng ELISA. Tám dòng vô tính có tính phản ứng chéo với cả FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno trong ELISA

được kiểm tra về khả năng liên kết vào các tế bào SVT2 mà biểu hiện FcRH5 có chiều dài đầy đủ của người, FcRH5 có chiều dài đầy đủ của khỉ cyno, hoặc protein E11 bằng FACS. Tất cả tám dòng vô tính này đều liên kết các tế bào SVT2 biểu hiện miền E11 của người, miền xuyên màng, và miền bào chất.

Để kiểm tra khả năng liên kết vào các tế bào ung thư mà biểu hiện FcRH5 theo kiểu nội sinh hoặc được chuyển nhiễm bằng FcRH5, thì các tế bào này được nâng lên bằng cách sử dụng EDTA/PBS, và $1x10^5$ tế bào được tạo huyền phù trong 100µl và được ủ với các kháng thể sơ cấp (1 thể tích của dịch nổi trên bề mặt của sản phẩm tái tạo dòng vô tính không được định lượng về IgG, dịch nổi trên bề mặt của sản phẩm tái tạo dòng vô tính được định lượng về IgG 4µg/ml hoặc các kháng thể đơn dòng đã tinh chế 2µg/ul). Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS (PBS, BSA 1%, EDTA 2mM) và được ủ với dịch pha loãng 1:1000 của kháng thể thứ cấp của dê kháng chuột nhắt đã được đánh dấu bằng PE hoặc dịch pha loãng 1:100 của APC của dê kháng chuột nhắt. Các tế bào được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS và phép phân tích đếm tế bào theo dòng chảy được thực hiện trên FACSCalibur. Phương pháp đánh dấu xenon trực tiếp các kháng thể được thực hiện theo quy trình của nhà sản xuất (Invitrogen), khi được chỉ định. Tuy nhiên, chỉ có ba dòng vô tính trong số các dòng vô tính này liên kết vào các tế bào biểu hiện FcRH5 có chiều dài đầy đủ của người và không có dòng vô tính nào liên kết vào các tế bào biểu hiện FcRH5 có chiều dài đầy đủ của khỉ cyno (Bảng 2).

Bảng 2. Khả năng liên kết của các mAb từ Chiến dịch gây miễn dịch B trong FACS vào các tế bào biểu hiện quá mức FcRH1, 2, 3, 4, và 5 của người, miền E11 của người, và FcRH5 của khỉ đuôi dài

	Khả năng liên kết trong FACS vào tế bào SVT2 biểu hiện:						
mAb	FcRH1 của người	FcRH2 của người	FcRH3 của người	FcRH4 của người	FcRH5 của người	E11-TM-ICD* của người	FcRH5 của khỉ đuôi dài
1E6	-	-	-	-	+	+	-
3D8	-	-	-	-	-	+	-
8G8	-	-	-	-	-	+	-
11A11	-	-	-	-	-	+	-
10D9	-	-	-	-	+	+	-
11H6	-	-	-	-	-	+	-
13D2	-	-	-	-	+	+	-
14E9	-	-	-	-	-	+	-

*: Miền E11, miền xuyên màng và miền bào chất của FcRH5 của người

B. Chiến dịch gây miễn dịch C và xác định đặc điểm mAb

Đối với Chiến dịch gây miễn dịch C, protein E11 được gắn đuôi His theo kiểu đầu tận cùng N được tạo ra trong các tế bào CHO. Các con chuột nhắt được gây miễn dịch bằng liều tiêm ban đầu là 100µg protein E11 trong chất phụ trợ Freund hoàn chỉnh vào phần gốc đuôi. Các con chuột này đã tiếp nhận tổng cộng 17 liều lượng, sau đó là một liều tiêm nhắc lại trước dung hợp trong một mình PBS thông qua IP và đường khớp cổ chân hai ngày trước khi dung hợp (Bảng 3).

Bảng 3. Lịch biểu gây miễn dịch của Chiến dịch gây miễn dịch C

Số liều tiêm	Chất phụ trợ	Đường dùng	Thể tích cho mỗi vị trí	Thể tích cho mỗi con vật	Lượng protein	Kháng nguyên
1	CFA	Phần gốc đuôi	100µl	100µl	100µg	E11 của người
2	IFA	Trong màng bụng	100µl	100µl	50µg	E11 của người
	IFA	Khớp cổ chân	50µl	100µl	50µg	E11 của người
3	IFA	Phần gốc đuôi	100µl	100µl	50µg	E11 của người
	IFA	Dưới da	100µl	100µl	50µg	E11 của người
	IFA	Trong màng bụng	100µl	100µl	50µg	E11 của người
4	IFA	Khớp cổ chân	100µl	100µl	50µg	E11 của người
	IFA	Trong màng bụng	100µl	100µl	50µg	E11 của người
5	IFA	Trong màng bụng	100µl	100µl	50µg	E11 của người
	IFA	Dưới da	100µl	100µl	50µg	E11 của người
	IFA	Phần gốc đuôi	100µl	100µl	50µg	E11 của người
6	IFA	Trong màng bụng	100µl	100µl	50µg	E11 của người
	IFA	Khớp cổ chân	100µl	100µl	50µg	E11 của người
7	IFA	Phần gốc đuôi	100µl	100µl	50µg	E11 của người

Số liều tiêm	Chất phụ trợ	Đường dùng	Thể tích cho mỗi vị trí	Thể tích cho mỗi con vật	Lượng protein	Kháng nguyên
	IFA	Dưới da	100µl	100µl	50µg	E11 của người
	IFA	Trong màng bụng	100µl	100µl	50µg	E11 của người
8	PBS vô trùng	Trong màng bụng	100µl	100µl	50µg	E11 của người
9	PBS vô trùng	Trong màng bụng	100µl	100µl	50µg	E11 của người
10	Ribi	Trong màng bụng	100µl	100µl	10µg	E11 của người
11	Ribi	Trong màng bụng	100µl	100µl	10µg	E11 của người
12	Ribi	Trong màng bụng	100µl	100µl	10µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
13	Ribi	Trong màng bụng	100µl	100µl	10µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
14	Ribi	Trong màng bụng	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
	Ribi	Khớp cổ chân	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
15	Ribi	Phần gốc đuôi	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
	Ribi	Dưới da	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
	Ribi	Trong màng bụng	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
16	Ribi	Trong màng bụng	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và

Số liều tiêm	Chất phụ trợ	Đường dùng	Thể tích cho mỗi vị trí	Thể tích cho mỗi con vật	Lượng protein	Kháng nguyên
						E11 của người
	Ribi	Khớp cổ chân	100µl	200µl	6,6µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
17	Ribi	Phần gốc đuôi	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
	Ribi	Dưới da	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
	Ribi	Trong màng bụng	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
Liều tiêm nhắc lại trước dung hợp	PBS vô trùng	Trong màng bụng	100µl	100µl	3,3µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người
	PBS vô trùng	Khớp cổ chân	100µl	200µl	6,6µg	E11 của khỉ đuôi dài và E11 của người

Sau 15 liều rotein E11 tái tổ hợp, sau đó là các liều tiêm đồng thời của protein E11 tái tổ hợp của người và protein E11 tái tổ hợp của khỉ cyno, huyết thanh được phân tích về các kháng thể liên kết FcRH5 bằng cách sử dụng FACS và bằng phương pháp chuẩn độ trong ELISA bằng cách sử dụng protein E11 làm kháng nguyên. Đã phát hiện thấy tính phản ứng đáng kể đối với các tế bào SVT2 biểu hiện FcRH5 có chiều dài đầy đủ của người, FcRH5 có chiều dài đầy đủ của khỉ cyno, hoặc miền E11 của người, miền xuyên màng, và miền bào chất, nhưng không phát hiện thấy đối với các tế bào SVT2 được chuyển nhiễm bằng vật truyền, chỉ báo rằng các kháng thể liên kết FcRH5 đã có mặt trong huyết thanh của tất cả năm con chuột nhắt được gây miễn dịch. Sau liều tiêm nhắc lại cuối cùng trong PBS, bạch huyết bào từ các con chuột

nhắt đã được gây miễn dịch được dung hợp bằng điện với các tế bào u tủy của chuột nhắt là P3X63Ag8U.1.22.

Các dòng vô tính được kiểm tra về khả năng liên kết vào protein E11 tái tổ hợp của người và protein E11 tái tổ hợp của khỉ cyno và khả năng liên kết vào các tế bào SVT2 biểu hiện FcRH5 có chiều dài đầy đủ của người; FcRH5 có chiều dài đầy đủ của khỉ cyno; FcRH1, FcRH2, FcRH3, hoặc FcRH4 có chiều dài đầy đủ của người; hoặc miền E11 của người, miền xuyên màng, và miền bào chất của FcRH5 bằng FACS. Có 44 dòng vô tính dương tính với protein E11 của người và 32 dòng vô tính dương tính với protein E11 của khỉ cyno theo ELISA. Trong số đó, tổng cộng 16 dòng vô tính được nhận diện là liên kết vào các tế bào biểu hiện FcRH5 của người và các tế bào biểu hiện FcRH5 của khỉ cyno, nhưng không liên kết vào các tế bào biểu hiện FcRH1, FcRH2, FcRH3, hoặc FcRH4, chỉ báo về tính phản ứng chéo loài của FcRH5 cụ thể (Bảng 4).

Bảng 4. Các thuộc tính liên kết của các kháng thể đơn dòng thu được từ Chiến dịch gây miễn dịch C

	Khả năng liên kết trong FACS vào tế bào SVT2 biểu hiện:									
mAb	FcRH1 của người	FcRH2 của người	FcRH3 của người	FcRH4 của người	FcRH5 của người	E11-TM-ICD* của người	FcRH5 của khỉ đuôi dài	Khả năng liên kết MOLP-2 FACS	Miễn E11 của người bằng KD (§)	Đoạn miễn E11 của khỉ đuôi dài bằng KD (§)
15G8	-	-	-	-	+	+	+/-	+/-	0,5nM	0,1nM
24H5	+	+	+	+	+	+	+	+	0,2nM	388nM
16H10	+	+	+	+	+	+	+	+	1,6nM	280nM
10A7	+	+	+	+	+	+	+	+	1,9nM	229nM
3C5	+	+	+	+	+	+	+	+	46nM	61nM
17G1	+	+	+	+	+	+	+	+	58nM	37nM
23E2	+	+	+	+	+	+	+	+	Không thực hiện (¶)	Không thực hiện (¶)
903	+	+	+	+	+	+	+	+	Không thực hiện	Không thực hiện
2388	+	+	+	+	+	+	+	+	Không thực hiện	Không thực hiện
23G8	+	+	+	+	+	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện
24F5	-	-	-	-	+	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện
24G6	-	-	-	-	+	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện
24C4	-	-	-	-	+/-	+	+/-	-	Không thực hiện	Không thực hiện
3C2	-	-	-	-	+	+	+/-	-	Không thực hiện	Không thực hiện
6H3	-	-	-	-	+/-	+	+/-	-	Không thực hiện	Không thực hiện
1D10	-	-	+	-	+	+	+	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
12B6	+	+	+	-	+	+	+	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
16A6	+	+	+	-	+	+	+	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
11C9	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
11H10	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
12E10	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
15B5	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
16H1	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
17A6	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
2A10	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
2F9	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
3E3	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
5G9	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
6G4	-	-	-	-	+	-	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
7E2	-	-	-	-	+/-	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
8E2	-	-	-	-	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
9A6	+	+	+	+	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
13C8	+	+	+	+	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
16E5	-	-	-	-	-	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
22C9	+	+	+	+	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
2389	+	+	+	+	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
4H3	+	+	+	+	+	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
581	-	-	-	-	-	+	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
1B9	-	-	-	-	-	+/-	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
2C3	-	-	-	-	-	+/-	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
3G2	-	-	-	-	-	+/-	-	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện
2G4	+	+	+	+	+	-	+	Không thực hiện	Không thực hiện	Không thực hiện

* Miễn E11, miễn ngoại màng và miễn bào chất của FcRH5 của người.

§ KD cộng hưởng plasmon bề mặt : BIACORE®, đã lực có hòa hợp một, các thử nghiệm về miễn E11 của người được thực hiện 1 đến 3 lần và được tính trung bình.

Các thử nghiệm về miễn E11 của khỉ đuôi dài được thực hiện một lần đối với mỗi kháng thể.

¶ Không thu được dòng vô tính tái tổ hợp nào đối với kháng thể 23E2.

IgG đã tinh chế từ 16 dòng vô tính kháng thể đơn dòng (mAb) đã chọn được xác định đặc điểm thêm về khả năng liên kết vào các tế bào biểu hiện FcRH5 của người theo kiểu nội sinh (tế bào MOLP-2). Tổng cộng tám dòng vô tính mAb được cho thấy là liên kết các tế bào u tủy MOLP-2. Hai dòng vô tính trong số tám dòng vô tính mAb này được phát hiện là dư thừa dựa trên phép phân tích trình tự và một dòng không được tách dòng ở cấp độ phân tử. Sáu dòng vô tính mAb dương tính với MOLP-2 đã được tách dòng ở cấp độ phân tử được biểu hiện theo kiểu tái tổ hợp ở dạng IgG2a của chuột và được kiểm tra về ái lực bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt trong thiết bị BIACORE® T200 ở dạng thức bắt IgG.

Nói một cách ngắn gọn, các kháng thể xét nghiệm được bắt trên các tế bào dòng chảy 2, 3 hoặc 4 trong đó tế bào dòng chảy 1 làm chuẩn tham chiếu trên chip Series S CM5 có protein A (GE Life Sciences, Piscataway, NJ). Mảnh protein FcRH5 được sử dụng làm chất phân tích, với tốc độ dòng chảy là 30µl/phút. Giữa các liều tiêm, bề mặt bắt được tái tạo bằng liều tiêm glyxin 10mM 30 giây, độ pH = 1,5 ở tốc độ dòng chảy là 10µl/phút. Các tương tác được đánh giá ở 25°C trong HEPES 10mM, độ pH = 7,4, NaCl 150mM, Tween 20 0,05% (HBSP). Dữ liệu tham chiếu từ tế bào dòng chảy tham chiếu và từ liều tiêm gồm chỉ một mình dung dịch đệm được trừ đi trước khi phân tích động học. Thông tin động học được tính toán bằng cách vẽ theo điểm dữ liệu theo mô hình liên kết 1:1. Phép trừ tham chiếu và vẽ theo điểm dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm BIAevaluation (GE Life Sciences, Piscataway, NJ).

Các ái lực có hóa trị một của các kháng thể này đối với miền E11 của người nằm trong khoảng từ 0,5nM đến 68nM trong khi các ái lực đối với miền E11 của khỉ đuôi dài nằm trong khoảng từ 9,1nM đến 338nM (Bảng 4). Chỉ một dòng vô tính có ái lực đối với miền E11 của người cao hơn so với kháng thể 1G7, mAb 15G8. Tuy nhiên, mức chênh lệch K_D giữa miền E11 của người và miền E11 của khỉ đuôi dài là gấp khoảng 20 lần, điều này khiến cho dòng vô tính này không phù hợp để phát triển lâm sàng thêm nữa. Ngoài ra, mặc cho ái lực cao của dòng vô tính kháng thể này đối với miền E11 đã được phân lập của người, nhưng khả năng liên kết của dòng vô tính kháng thể này vào các tế bào MOLP-2 vẫn rất yếu; khả năng này yếu hơn so với các dòng vô tính có các ái lực thấp hơn đối với miền E11 đã được phân lập của người, chỉ báo rằng dòng vô tính này không liên kết tốt vào protein FcRH5 nguyên thể của người.

Ví dụ 2. Tạo và xác định đặc điểm các biến thể kháng thể kháng FcRH5 từ các Chiến dịch gây miễn dịch A và C

A. Quá trình biến đổi giống như của người cho các kháng thể đơn dòng kháng FcRH5 từ Chiến dịch gây miễn dịch A

Kháng thể kháng FcRH5 1G7 từ Chiến dịch gây miễn dịch A, được mô tả trong tài liệu: Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2015/0098900, được biến đổi giống như

của người bằng phương pháp ghép HVR như được mô tả trước đây (Presta et al. *Cancer Res.* 57:4593-4599,1997), ngoại trừ các khung Vκ1 và VH4 liên ứng (Dennis, *Current Trends in Monoclonal Ant. Develop. and Manufac.* 9-28, 2010) được sử dụng làm các khung nhận. Dạng ghép chuỗi nặng cũng bao gồm các gốc của chuột tại khung ở các vị trí theo Kabat là 37, 48, 67, 71, 73, 78, 93, và 94, và dạng ghép chuỗi nhẹ cũng bao gồm các gốc của chuột tại khung ở các vị trí 36 và 43 để trình diện HVR đúng đắn và tiếp xúc miền VH/VL. Số hiệu gốc là theo tài liệu: Kabat et al. (Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th Ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, Md., 1991). Trình tự của 1G7 đã biến đổi giống như của người, trong bản mô tả này được gọi là hu1G7.v1 hoặc 1G7.v1, được thể hiện ở Fig.2 và Fig.3.

B. Quá trình làm trưởng thành ái lực và quá trình xác định đặc điểm cho các biến thể hu1G7.v1

Để tăng cường độ công hiệu, kháng thể đã được biến đổi giống như của người hu1G7.v1 được làm trưởng thành ái lực bằng cách sử dụng phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn. Nói một cách ngắn gọn, các thư viện ngẫu nhiên của mảnh kháng thể Fab trên bề mặt của thể thực khuẩn M13 được biểu hiện và được sàng lọc về các chất liên kết với mảnh protein FcRH5 đã được biotin hóa. Các đột biến ưu tiên được nhận diện bằng phương pháp giải trình tự ADN đối với các dòng vô tính riêng biệt. Các đột biến ưu tiên này tạo thành tiền đề để có được các biến thể có ái lực cải thiện (Li et al. *MAbs.* 6:437-445, 2014). Các dòng vô tính kháng thể có các đột biến đã chọn lọc được kiểm tra về ái lực bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt (Bảng 5A và Bảng 5B).

Nói một cách ngắn gọn, bề mặt bắt IgG của người được tạo ra trên chip Series S CM5 bằng cách sử dụng phương pháp liên hợp amin và bộ kit bắt IgG của người (GE Life Sciences, Piscataway, NJ). Sau đó, các kháng thể xét nghiệm được bắt trên các tế bào dòng chảy 2, 3, hoặc 4, trong đó tế bào dòng chảy 1 được sử dụng làm chuẩn tham chiếu. Mảnh protein FcRH5 được sử dụng làm chất phân tích, với tốc độ dòng chảy là >30µl/phút. Giữa các liều tiêm, bề mặt bắt được tái tạo bằng liều tiêm 30 giây gồm magie clorua 3M hoặc glyxin 10mM, độ pH = 1,5.

Các tương tác được đánh giá ở 25°C trong HEPES 10mM, độ pH = 7,4, NaCl 150mM, và Tween 20 0,05% (HBSP). Dữ liệu tham chiếu từ tế bào dòng chảy tham chiếu và từ liều tiêm gồm một mình dung dịch đệm được trừ đi trước khi phân tích động học. Thông tin động học được tính toán bằng cách vẽ theo điểm dữ liệu theo mô hình liên kết 1:1. Phép trừ tham chiếu và vẽ theo điểm dữ liệu được thực hiện bằng cách sử dụng phần mềm BIAevaluation (GE Life Sciences, Piscataway, NJ).

Đối với các thử nghiệm sàng lọc ái lực ban đầu, các kháng thể được bắt một cách trực tiếp từ các môi trường nuôi cấy đã được làm trong thu gom được sau quá trình chuyển nhiễm nhất thời các tế bào Expi293 (Invitrogen) (các Bảng 5A-5B). Khả năng của mỗi kháng thể trong việc liên kết mảnh protein FcRH5 được đánh giá ở 100nM và 500nM (Thử nghiệm 1, các Bảng 5A-5B) hoặc 0nM, 20nM, 100nM, và 500nM (Thử nghiệm 2, các Bảng 5A-5B). Hiện tượng kết hợp và hiện tượng phân ly được theo dõi ở tốc độ dòng chảy là 30µl/phút, lần lượt trong 180 giây và 600 giây. Tất cả các trình tự có mặt trong Bảng 5A được bộc lộ trong các SEQ ID NO: 4-6 (tức là, dạng liên ứng rộng FcRH5 L1, L2, L3). Tất cả các trình tự có mặt trong Bảng 5B được bộc lộ trong các SEQ ID NO: 1-3 (tức là, dạng liên ứng rộng FcRH5 H1, H2, H3). Các mức cải thiện ái lực lên đến 5,2 lần được quan sát thấy (Bảng 5A). Khi mà mỗi đột biến riêng biệt không đem lại các mức cải thiện mong muốn, thì quyết định là kết hợp các đột biến khác nhau với một điểm trung tâm ở các đột biến VL S30R, I32L, A51G, S52Y, Y53N, T56S, H91Q, Y92F, S93Q, và S94P và các đột biến VH S28K, L29T, và S56T.

Bảng 5A. Sàng lọc ái lực đối với các kháng thể được chọn

Thử nghiệm	Dòng vô tính	K_D sàng lọc (nM)	Mức cải thiện gấp mấy lần của K_D sàng lọc so với (các) đối chứng hu1G7.v1	HVR-L1											HVR-L2							HVR-L3							
				24	25	26	27	28	29	30	31	32	33	34	50	51	52	53	54	55	56	89	90	91	92	93	94	95	96	97
				K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
1	LC.01	5	5,2	K	A	S	Q	D	V	S	N	L	V	V	S	A	S	Y	R	Y	S	Q	Q	H	Y	S	P	P	Y	T
1	LC.02	5	5,0	K	A	S	Q	D	V	S	N	L	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	Q	S	P	Y	T
2	LC.03	6	4,3	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	P	P	Y	T
2	LC.04	6	4,2	K	A	S	Q	D	V	S	N	L	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	Q	S	P	Y	T
1	LC.05	6	4,0	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	P	P	Y	T
1	LC.06	7	3,6	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	P	P	Y	T
1	LC.07	8	3,1	K	A	S	H	D	V	S	N	I	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	Q	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.08	8	3,0	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	A	Y	Y	R	Y	T	Q	Q	Q	F	S	S	P	Y	T
1	LC.09	9	2,9	K	A	S	Q	D	V	R	N	I	V	V	S	A	S	N	R	Y	T	Q	Q	Q	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.10	10	2,5	K	A	S	Q	D	V	R	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	Q	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.11	10	2,5	K	A	S	Q	D	V	R	N	I	V	V	S	A	S	N	R	Y	T	Q	Q	Q	Y	S	S	P	Y	T
1	LC.12	10	2,4	K	A	S	Q	D	V	S	N	L	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	R	S	P	Y	T
2	LC.13	11	2,3	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	G	S	Y	R	Y	S	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.14	11	2,3	K	A	S	Q	D	V	K	N	I	V	V	S	A	S	D	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	P	P	Y	T
1	LC.15	11	2,3	K	A	S	Q	D	V	S	N	L	V	V	S	S	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.16	11	2,2	K	A	S	Q	D	V	R	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	Q	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.17	12	2,0	K	A	S	Q	D	V	K	N	I	V	V	S	A	S	D	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	T	P	Y	T
2	LC.18	12	2,0	K	A	S	Q	R	V	S	N	I	V	V	S	S	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.19	12	2,0	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	Q	Y	S	S	P	Y	T
1	LC.20	13	1,9	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	T	P	Y	T
2	LC.21	13	1,8	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	A	Y	Y	R	Y	S	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
1	LC.22	14	1,8	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.23	14	1,7	K	A	S	Q	D	V	K	N	I	V	V	S	A	A	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
1	LC.24	14	1,7	K	A	S	Q	D	V	S	N	L	V	V	S	A	S	Y	R	Y	H	Q	Q	H	Y	A	S	P	Y	T
2	LC.25	15	1,7	K	A	S	R	D	V	S	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	F	T
1	LC.26	15	1,7	K	A	S	Q	S	V	S	N	I	V	V	S	G	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
1	LC.27	15	1,6	K	A	S	Q	D	V	S	N	L	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	A	S	P	Y	T
2	LC.28	15	1,6	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	G	S	N	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.29	17	1,4	K	A	S	Q	D	V	R	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.30	17	1,4	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	A	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
1	LC.31	19	1,3	K	A	S	Q	N	V	S	N	I	V	V	S	S	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.32	20	1,2	K	A	S	Q	E	V	S	N	I	V	V	S	A	S	F	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.33	20	1,2	K	A	S	Q	D	V	S	R	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	S	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.34	20	1,2	K	A	S	K	D	V	S	N	I	V	V	S	A	P	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.35	21	1,2	K	A	S	Q	E	V	R	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.36	21	1,2	K	A	S	K	D	V	S	N	I	V	V	S	A	T	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
1	LC.37	22	1,1	K	A	S	Q	D	V	S	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	R	S	P	Y	T
1	LC.38	24	1,1	K	A	S	Q	N	V	S	N	I	V	V	S	A	S	Y	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T
2	LC.39	43	0,6	K	A	S	H	D	V	S	N	I	V	V	S	A	S	D	R	Y	T	Q	Q	H	Y	S	S	P	Y	T

Bảng 5B. Sàng lọc ái lực đối với các kháng thể được chọn

Thử nghiệm	Chuẩn tham chiếu	K_D sàng lọc (nM)	Mức cải thiện gấp mấy lần của K_D sàng lọc so với (các) đối chứng hu1G7.v1	HVR-H1 / HVR-H2 / HVR-H3
1	HC.01	15	1,7	RLTRFGVH VIWRGGSIDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
1	HC.02	17	1,5	STTRFGVH VIWRGGTTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
1	HC.03	20	1,3	STTRFGVH VIWRGGTTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
2	HC.04	20	1,2	RLTRFGVH VIWRGGRTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
2	HC.05	22	1,1	SLTRFGVH VIWRGGSTDYNAAFMSHYYGSQDYALDN
1	HC.06	23	1,1	SITRFGVH VIWRGGSTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
1	HC.07	23	1,1	SITRFGVH VIWRGGRTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
2	HC.08	25	1,0	SLRRFGVH VIWRGGLTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
1	HC.09	26	1,0	SLTRFGVH VIWRSGSTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
2	HC.10	26	0,9	SLIRFGVH VIWRGGSTDYNAAFMSHYYGSQDYALDN
1	HC.11	26	0,9	STTRFGVH VIWRGGTTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
2	HC.12	28	0,9	SLTRFGVH VIWRGGSIDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
1	HC.13	30	0,8	SVTRFGVH VIWRGGSTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
2	HC.14	30	0,8	SLNRFGVH VIWRGGTTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
1	HC.15	32	0,8	SITRFGVH VIWRGGSTDYNAAFMSHYYGSIDYALDN
2	HC.16	33	0,7	SLRRFGVH VIWRGGSTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
1	HC.17	45	0,6	SLNRFGVH VIWRGGHTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
2	HC.18	46	0,5	LLTRFGVH VIWRNGSTDYNAAFMSHYYGSQDYALDN
2	HC.19	48	0,5	SLTRFGLH VIWRDGSTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN
2	HC.20	50	0,5	SLRRFGVH VIWRGGSTEYNAAFMSHYYGSSDYALDN
1	HC.21	67	0,4	SLTRFGVH VIWRGGRTDYNAAFMSHYYGSSDYALDN

Các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn của kháng thể được thiết kế bằng cách sử dụng cả phương pháp gây đột biến hướng vị trí cứng và phương pháp gây đột biến hướng vị trí mềm. Các thư viện L188 và L189 sử dụng phương pháp gây đột biến mềm để gây đột biến các gốc VL 27-34, 50-56, 91-94, và 96 (L188) hoặc các gốc VH 28-35, 50-58, và 95-100d (L189). Ở các vị trí gây đột biến, các oligonucleotit gây đột biến mềm sử dụng 91% nucleotit mã hóa ban đầu và 3% mỗi nucleotit khác. Các thư viện L190 và L191 sử dụng phương pháp gây đột biến cứng (các codon *NNK*) để gây đột biến các gốc VL 27-34, 50-56, và 89-96 (L190) hoặc các gốc VH 28-35, 50-58 và 95-100d (L191), từng codon một, có lên đến ba HVR được gây đột biến một cách đồng thời (Li et al. *MAbs*. 6:437-445, 2014).

Tối đa bốn vòng chọn lọc để liên kết vào mảnh protein FcRH5 được thực hiện. Các lần chọn lọc được thực hiện cả trong pha rắn (protein đích được hấp phụ một cách trực tiếp lên trên vi đĩa) và trong dung dịch. Đối với các lần chọn lọc trong dung dịch, protein đích đã được biotin hóa được sử dụng để giúp bắt được các phức hợp đích-thể thực khuẩn-kháng thể. Các dòng vô tính có các đột biến đã được chọn lọc được biểu hiện trong các tế bào Expi293 (Thermo Fisher Scientific, Waltham, MA), và các dịch nổi trên bề mặt được sàng lọc bằng phương pháp cộng hưởng plasmon bề mặt.

Các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn kháng thể được tạo ra bằng phương pháp gây đột biến Kunkel (Kunkel et al. Methods in Enzymology, 154:367-382, 1987) bằng cách sử dụng làm khuôn mẫu là ADN sợi đơn được tạo ra trong vi khuẩn CJ236 và được tinh chế bằng cách sử dụng bộ kit Qiagen QIAprep Spin M13 (QIAGEN, Inc., Valencia, CA). ADN khuôn mẫu dùng cho các thư viện trưởng thành ái lực ban đầu chứa các codon kết thúc ở các HVR đã được chọn lọc cho quá trình gây đột biến đó; ADN khuôn mẫu dùng cho thư viện thể thực khuẩn "được tập trung" kế tiếp mô tả dưới đây không sử dụng các codon kết thúc của HVR khuôn mẫu. Trừ khi được chỉ ra khác đi, các gốc trong các vùng biến đổi của kháng thể được đánh số theo hệ thống Kabat. Các enzym được mua từ New England Biolabs (Ipswich, MA). Các phản ứng của phương pháp gây đột biến Kunkel được dọn sạch bằng cách sử dụng các cột quay mini QIAprep (QIAGEN, Inc., Valencia, CA) và được biến nạp vào chủng XLI Blue *E. coli* (Agilent Technologies, Santa Clara, CA) bằng phương pháp biến nạp bằng xung điện. Sau quá trình thu hồi trong môi trường SOC ở 37°C, các môi trường nuôi cấy được gây nhiễm bằng thể thực khuẩn trợ giúp và được ủ ở 37°C trong khoảng thời gian 0,5-2 giờ nữa trước khi bổ sung các chất kháng sinh carbenixillin và kanamyxin vào. Sau đó, các môi trường nuôi cấy này được ủ ở 37°C trong khoảng thời gian 4-5 giờ nữa, sau đó ủ thêm qua đêm ở 30°C. Thể thực khuẩn được tinh chế từ môi trường nuôi cấy đã được làm trong bằng cách kết tủa với xấp xỉ 1/6 thể tích của chất phản ứng kết tủa (PEG 20%, natri clorua 2,5M). Thể thực khuẩn đã được kết tủa được tạo viên kết bằng phương pháp ly tâm và được hòa tan trong dung dịch muối được đệm phosphat (PBS). Dung dịch này được làm trong hơn nữa bằng phương pháp ly tâm ở 14.000g. Thể thực khuẩn đã

được tinh chế được tích trữ trong glyxerol 50% trong máy đông lạnh -20°C và được hòa tan lại trong PBS trước khi sử dụng.

Trong phương pháp theo kiểu Rational Design, sáu đột biến VL đã được nhận diện từ các thử nghiệm thể thực khuẩn (S30R, I32L, A51G, T56S, H91Q, và S94P) được kết hợp với đột biến biến đổi giống như của người VL phụ thêm S43A và được đánh giá theo cặp để đánh giá độ tương thích (Bảng 6). Để đánh giá độ tương thích của các đột biến VL đã chọn (Bảng 6), các kháng thể được bắt một cách trực tiếp từ các môi trường nuôi cấy đã được làm trong thu gom được sau quá trình chuyển nhiễm nhất thời các tế bào Expi293. Khả năng liên kết của mảnh protein FcRH5 được đánh giá ở 6nM, 19nM, 56nM, 167nM, và 500nM ở tốc độ dòng chảy là 30µl/phút. Hiện tượng kết hợp và hiện tượng phân ly được theo dõi lần lượt trong 300 giây và 600 giây. Các trình tự được bộc lộ trong Bảng 6 là các axit amin riêng biệt (tức là, số nêu ở phần trên cùng của cột là số axit amin trong phạm vi trình tự kháng thể). Các kết quả này đã cho thấy rằng các đột biến VL I32L và H91Q, mặc dù cải thiện ái lực một cách riêng biệt, nhưng không giúp ích cho ái lực khi được kết hợp. Tuy nhiên, các trình tự được kiểm tra khác đã cho các mức cải thiện ái lực gia tăng gấp đến bốn lần so với đối chứng hu1G7.v1. Dựa trên các kết quả này, các kháng thể hu1G7.v1.1, hu1G7.v1.2, hu1G7.v1.3 và hu1G7.v1.4 (Fig.2 và Fig.3) được thiết kế. Kháng thể hu1G7.v1.1 được thiết kế để sáp nhập sáu đột biến VL S30R, I32L, A51G, T56S, H91Q, và S94P. Kháng thể hu1G7.v1.2 được thiết kế để sáp nhập mười đột biến VL S30R, I32L, A51G, S52Y, Y53N, T56S, H91Q, Y92F, S93Q, và S94P. Các kháng thể hu1G7.v1.3 và hu1G7.v1.4 là dựa trên hu1G7.v1.1 và được thiết kế để lược bỏ I32L (hu1G7.v1.3) hoặc H91Q (hu1G7.v1.4).

Bảng 6. Phân tích kết hợp các đột biến được nhận diện thông qua biểu hiện thể thực khuẩn kháng thể

Tên mẫu	$KD_{Đối\ chứng}$* /$KD_{Mẫu}$	HVR-L1					HVR-L2				HVR-L3			
	* Giá trị trung bình, n=2	số 30	số 32			số 43	số 51		số 56		số 91		số 94	
LC.H91Q.S94P	4,1		S		I	A	A		T		Q		P	
LC.A51G.S94P	3,6		S		I	A	G		T		H		P	
LC.I32L.A51G	2,8		S		L	A	G		T			H		S
LC.I32L.S94P	2,7		S		L	A	A		T		H		P	
LC.S30R.I32L	2,2	R		L		A	A		T			H		S
LC.T56S.S94P	2,1		S		I	A	A		S			H		P
LC.S30R.S94P	2,1	R			I	A	A		T			H		P
LC.A51G.H91Q	2,1	S			I	A	G		T			Q		S
LC.S30R.H91Q	1,7		R		I	A	A		T			Q		S
LC.S30R.A51G	1,6		R		I	A	G		T			H		S
LC.A51G.T56S	1,5		S		I	A		G		S		H		S
LC.T56S.H91Q	1,3		S		I	A	A		S			Q		S
LC.I32L.T56S	1,3	S		L		A	A		S			H		S
hu1G7.v1 (Đối chứng)	1,0		S		I	S	A		T			H		S
hu1G7.v1 (Đối chứng)	1,0		S		I	S	A		T			H		S
LC.I32L.H91Q	0,7	S		L		A	A		T		Q		S	

Thư viện thể thực khuẩn tập trung dùng để nghiên cứu các đột biến đang

được quan tâm (các đột biến VL S30R, I32L, A51G, S52Y, Y53N, T56S, H91Q, Y92F, S93Q, S94P; các đột biến VH S28K, L29T, S56T) trong nhiều dạng kết hợp khác nhau cũng được thiết kế. Trong nỗ lực nhằm làm tăng thêm độ tương đồng với các trình tự kháng thể của người, thư viện thể thực khuẩn tập trung cũng cho phép thay đổi có giới hạn ở các vị trí khung như sau: S43A ở LC, L48I ở HC, và/hoặc N73T ở HC. Đã thu được xấp xỉ 10^8 thể biến nạp. Các lần chọn lọc được thực hiện bằng cách sử dụng mảnh protein FcRH5 làm "mồi". Các lần chọn lọc được thực hiện ban đầu bằng protein đích đã được làm bất động trong pha rắn, với các lần chọn lọc trong pha dung dịch được sử dụng trong các vòng sau. Các kháng thể hu1G7.v1.5, hu1G7.v1.7, hu1G7.v1.13, và hu1G7.v1.13.1 (Fig.2 và Fig.3) được tạo ra từ thư viện này.

Dữ liệu giải trình tự từ các thử nghiệm với thư viện thể thực khuẩn tập trung cũng củng cố cho khái niệm (các Bảng 5A-5B) về sự tương tác âm giữa các đột biến VL I32L và H91Q. Sau năm vòng chọn lọc trên thể thực khuẩn và phép phân tích kế tiếp đối với 163 trình tự VL, thì tần suất của glutamin ở vị trí 91 trong VL được phát hiện là cao hơn nhiều khi có mặt lle32 (49/70 dòng vô tính) so với khi có mặt Leu32 (5/93 dòng vô tính). Không quan sát thấy tác dụng này ở thư viện chưa được chọn lọc, trong đó Gln91 được quan sát thấy ở 50% (9/18) các dòng vô tính được phân tích mà chứa leuxin ở vị trí 32. Các kết quả này đã cho thấy sự chọn lọc âm đối với các dòng vô tính chứa cả I32L và H91Q, mặc cho sự làm giàu dương của mỗi trong số các đột biến này trong các bối cảnh khác.

Tính nhạy với sự oxy hóa được nghiên cứu bằng cách ủ kháng thể này với 2,2'-azobis(2-metylpropionamidin)dihydroclorua (AAPH) 1mM trong 16 giờ, sau đó phân giải bằng trypsin để tạo ra các peptit mà có thể được phân tích bằng cách sử dụng phép phân tích sắc ký lỏng (LC)-đo phổ khối (MS). Đối với mỗi peptit trong mẫu, đã thu được thông tin về thời gian lưu từ LC, và thông tin về phân mảnh ion peptit, độ phân giải cao và khối lượng chính xác (thông tin trình tự axit amin) trong MS. Phổ sắc ký ion được trích xuất (XIC) được lấy đối với các peptit đang được quan tâm (ion peptit nguyên thể và ion peptit được cải biến) từ các tập hợp dữ liệu ở mức cửa sổ là ±10 phần triệu, và các đỉnh được tính tích phân để xác định diện tích. Tỷ lệ

cải biến tương đối tính theo phần trăm được tính toán đối với mỗi mẫu như sau: (diện tích của peptit được cải biến) / (diện tích của peptit được cải biến cộng với diện tích của peptit nguyên thể) x 100. Sau đó, các mức tỷ lệ phần trăm tương đối này được đem so sánh giữa mẫu đối chứng và mẫu được điều trị bằng AAPH.

Sau 16 giờ ủ ở 40°C khi có mặt AAPH 1mM, đã quan sát thấy sự gia tăng oxy hóa của Met64 và Trp52 của HVR-H2 (lần lượt là 44,5% và 52,7%). Ngoài ra, mức oxy hóa Trp52 đã tăng từ 2% lên 62% sau ứng suất ánh sáng, và quá trình gây đột biến Trp-52_{HC} đã dẫn đến hiện tượng hao ái lực đối với các biến thể 1G7.v1.4, như được đo bằng BIACORE® (Fig.4). Các cải biến dạng thay thế của Trp52 bằng phenylalanin, tyrosin, leuxin, hoặc histidin và các cải biến dạng thay thế của Met64 bằng phenylalanin, isoleuxin, valin, hoặc leuxin được nghiên cứu trong bối cảnh của các chuỗi nhẹ từ các kháng thể hu1G7.v1, hu1G7.v1.3, hu1G7.v1.4, hu1G7.v1.5, hu1G7.v1,6, và hu1G7.v1.7 (Fig.2 và Fig.3). Cụ thể là, quá trình gây đột biến W52 thành F, Y, L, hoặc H đã đem lại trị số K_D lần lượt là 119nM, 131nM, 92nM, và 60,4nM. Trong khi đó quá trình gây đột biến M64 thành V trong 1G7.v85 đã đem lại K_D là 2,5nM. Đối với quá trình sàng lọc ái lực của các biến thể Met64 và Trp52 của HVR-H2 (Bảng 7), các kháng thể được biểu hiện bằng cách chuyển nhiễm nhất thời các tế bào Expi293 và được tinh chế bằng cách sử dụng các cột mũi mà được dồn đầy tùy chỉnh bằng nhựa ái lực MabSelect SuRe (Glygen Corp., Columbia, MD & GE Life Sciences, Piscataway, NJ). Các kháng thể đối chứng hu1G7.v1 và hu1G7.v1.5 được biểu hiện bằng cách chuyển nhiễm nhất thời các tế bào 293T và được tinh chế bằng MabSelect SuRe. Khả năng liên kết mảnh protein FcRH5 vào các kháng thể đã được bắt được theo dõi ở 100nM và 500nM. Hiện tượng kết hợp và hiện tượng phân ly được theo dõi ở tốc độ dòng chảy là 40µl/phút, lần lượt trong 180 giây và 300 giây. Các kết quả này, được thể hiện ở Bảng 7, đã cho thấy rằng Met64 của HVR-H2 có thể được gây đột biến thành valin trong khi duy trì ái lực cao đối với FcRH5.

Kháng thể hu1G7.v1.4 được chọn lọc dựa trên ái lực và tính chọn lọc đối với FcRH5 hơn các thành viên họ FcRH khác. Để cải thiện tính kháng của kháng thể này đối với sự oxy hóa, đột biến M64V được mô tả ở Bảng 7 cũng được sát nhập vào vùng VH. Kháng thể hu1G7.v1.4.M64V thu được được ghi là hu1G7.v85

(Fig.5A-Fig.5B) và được tạo ra ở dạng IgG có hóa trị hai và ở dạng kháng thể đặc hiệu kép phụ thuộc vào tế bào T (TDB). Trình tự của hu1G7.v85 được trình bày ở Fig.6A-Fig.6B và Fig.5A-Fig.5B. Phép phân tích động học của hu1G7.v85 được thể hiện ở Bảng 8. Phép phân tích của hu1G7.v1.4 được thể hiện để so sánh. Các mức chênh lệch được quan sát thấy đối với K_D của hu1G7.v1.4 (các Bảng 7 và 8) là nằm trong khoảng biến thiên thử nghiệm được dự kiến cho các phân tử này.

Cũng đã sản xuất ra phiên bản không được làm trưởng thành ái lực của hu1G7.v.1, hu1G7.v87, phiên bản này sở hữu các HVR của 1G7 chuột nhắt ở khung đã biến đổi giống như của người được mô tả ở trên, có đột biến M64V để cải thiện tính kháng oxy hóa.

Bảng 7. Sàng lọc ái lực đối với biến thể HVR-H2 ở các vị trí 52 và 54 của hu1G7.v1

K_D sàng lọc (M)		Chuỗi nhẹ từ kháng thể:					
		hu1G7.v1	hu1G7.v1.3	hu1G7.v1.4	hu1G7.v1.5	hu1G7.v1.6	hu1G7.v1.7
Đột biến chuỗi nặng	Không có	$2,7 \times 10^{-8}$	-	-	$2,0 \times 10^{-9}$	-	-
	W52F	$2,5 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-7}$	$1,2 \times 10^{-7}$	$4,8 \times 10^{-8}$	$8,1 \times 10^{-8}$	$7,7 \times 10^{-8}$
	W52Y	$1,5 \times 10^{-7}$	$6,4 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-7}$	$1,8 \times 10^{-7}$	$5,3 \times 10^{-7}$	$1,4 \times 10^{-7}$
	W52L	$1,0 \times 10^{-7}$	$2,4 \times 10^{-7}$	$9,2 \times 10^{-8}$	$1,3 \times 10^{-7}$	$2,5 \times 10^{-7}$	$1,3 \times 10^{-7}$
	W52H	$1,2 \times 10^{-7}$	$6,6 \times 10^{-8}$	$6,0 \times 10^{-8}$	$6,7 \times 10^{-8}$	$1,1 \times 10^{-7}$	$9,0 \times 10^{-8}$
	M64I	$3,0 \times 10^{-8}$	$2,1 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$2,7 \times 10^{-9}$	$2,7 \times 10^{-9}$	$2,6 \times 10^{-9}$
	M64V	$2,7 \times 10^{-8}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$2,7 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-9}$
	M64L	$2,7 \times 10^{-8}$	$2,4 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$2,3 \times 10^{-9}$	$2,6 \times 10^{-9}$	$2,0 \times 10^{-9}$
	M64F	$2,6 \times 10^{-8}$	$2,2 \times 10^{-9}$	$2,5 \times 10^{-9}$	$1,4 \times 10^{-9}$	$2,6 \times 10^{-9}$	$2,4 \times 10^{-9}$

Bảng 8. Phép phân tích động học của hu1G7.v1.4 và hu1G7.v85 ở dạng thức hIgG1 và dạng thức TDB

Kháng thể	Dạng thức	FcRH5 của người			FcRH5 của khỉ cyno		
		K_D (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)	K_D (nM)	Ka (1/Ms)	Kd (1/s)
1G7.v1.4	hIgG1	2,6	7×10^5	2×10^{-3}	7,7	1×10^5	1×10^{-3}
	TDB	2,4	5×10^5	1×10^{-3}	6,3	1×10^5	8×10^{-4}
1G7.v85	hIgG1	2,5	6×10^5	2×10^{-3}	7,2	1×10^5	1×10^{-3}
	TDB	2,4	4×10^5	1×10^{-3}	6,8	1×10^5	8×10^{-4}

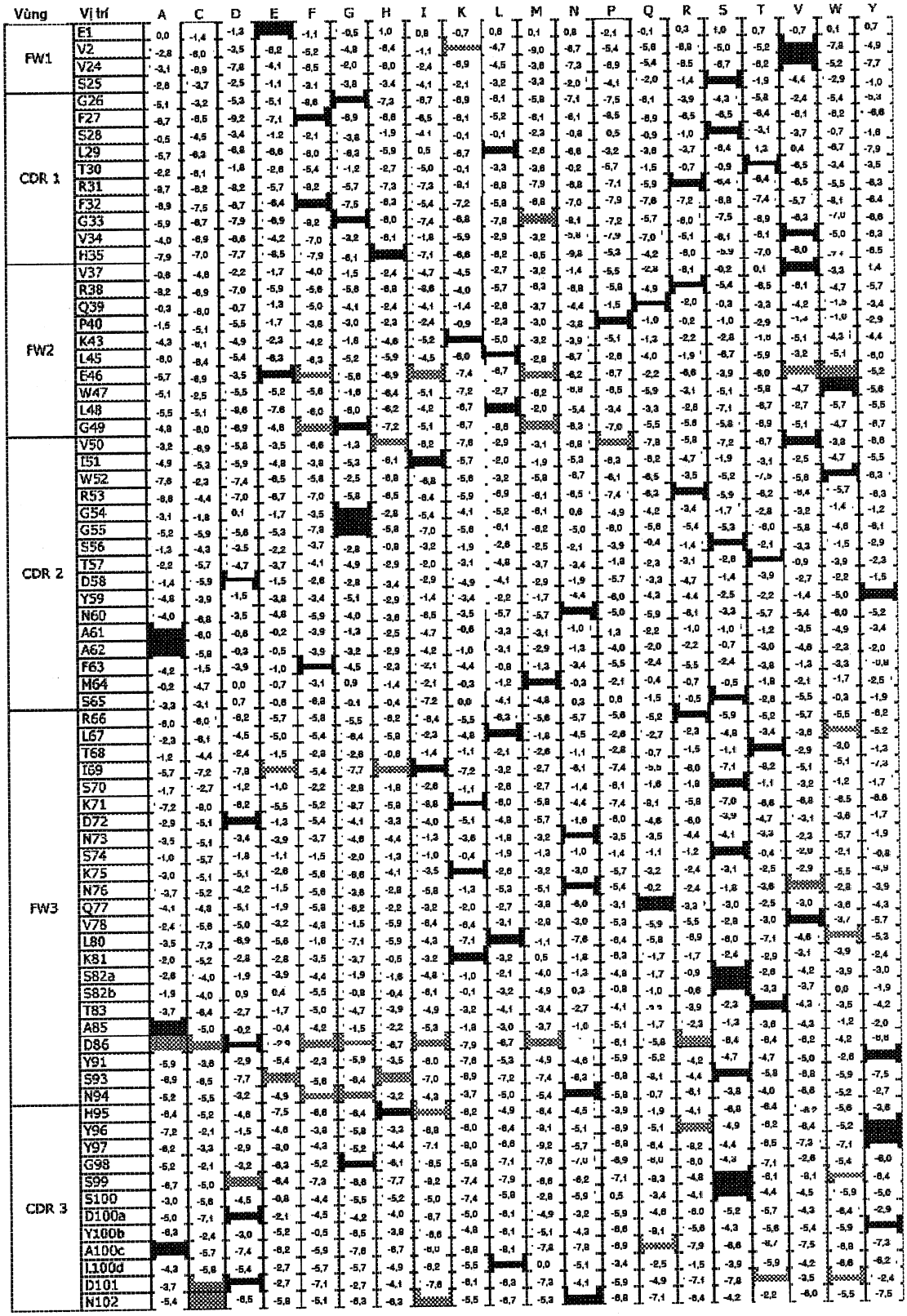
Một phương pháp làm trưởng thành ái lực phụ khác nữa đã sử dụng kỹ thuật giải trình tự Sanger để chọn ngẫu nhiên các vị trí HVR của chuỗi nặng; tuy nhiên, không nhận diện được đột biến mong muốn nào bằng phương pháp này. Do đó, số lượng vị trí được kiểm tra về các biến thể và độ sâu sàng lọc có sử dụng phương pháp giải trình tự thế hệ tiếp theo (phương pháp giải trình tự Illumina) được tăng lên. Thư viện được thiết kế trong đó các vị trí đã được chọn trong vùng biến đổi chuỗi nặng được lấy ngẫu nhiên với codon *NNK*, phần này mã hóa axit amin bất kỳ hoặc codon kết thúc hổ phách. Thiết kế này cho phép thay đổi chỉ một axit amin trong các vùng biến đổi của kháng thể trong mỗi dòng vô tính. Các vị trí này được chọn từ các HVR và các vị trí khung tiếp xúc trực tiếp hoặc gần với các HVR. Các vị trí Kabat 1, 2, từ 24 đến 40, 43, từ 45 đến 78, từ 80 đến 83, 85, 86, 91, và từ 93 đến 102 được lấy ngẫu nhiên. Thư viện được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp ADN (Genewiz), tạo ra 75 mảnh ADN tuyến tính độc lập có một vị trí trong mỗi mảnh được lấy ngẫu nhiên với codon *NNK*. Các mảnh ADN tuyến tính được gộp lại và được tách dòng vào vật truyền biểu hiện thể thực khuẩn mảnh Fab có hóa trị một (Lee et al. J. Immunol. Methods 284:119-132, 2004) chứa vùng biến đổi chuỗi nhẹ không có đột biến trưởng thành ái lực. Các sản phẩm thắt được điện di vào *E. coli* XL-1, được gây bội nhiễm bằng thể thực khuẩn trợ giúp M13 KO7 (New England Biolabs) và được làm tăng trưởng như được mô tả. Các chất liên kết được chọn lọc trong ba vòng phân loại bằng FcRH5 của người hoặc FcRH5 của khỉ đuôi dài theo phương thức thử nghiệm song

song. Đối với các lần chọn lọc này, các đĩa ELISA được phủ neutravidin (Pierce) được sử dụng để bắt Miền 8 của FcRH5 đã được biotin hóa của người hoặc FcRH5 đã được biotin hóa của khỉ đuôi dài ở 50ng/ml trong PBS. Thể thực khuẩn ($1OD_{268}$/ml) được ủ với FcRH5 bất động trong hai giờ ở nhiệt độ trong phòng và thể thực khuẩn không liên kết được loại bỏ bằng cách rửa 10 lần bằng PBS. Thư viện và thể thực khuẩn đã chọn được sử dụng để gây nhiễm *E. coli* XL-1, ADN plasmit được chiết và các cải biến dạng cài xen được khuếch đại bằng phương pháp khuếch đại PCR 15 chu kỳ bằng cách sử dụng polymeraza ADN Phusion (New England Biolabs), sau đó tinh chế gel agaroza các sản phẩm khuếch đại đó. ADN từ thể thực khuẩn từ thư viện ban đầu ($2OD_{268}$) được chiết bằng bộ kit tinh chế ADN M13 (Qiagen) và 200ng ADN được sử dụng làm khuôn mẫu để khuếch đại các cải biến dạng cài xen bằng cách sử dụng các điều kiện giống như ở trên. Các sản phẩm khuếch đại được giải trình tự bằng phương pháp giải trình tự Illumina như được mô tả trước đây (Koenig et al. J. Biol. Chem. 290:21773–21786, 2015). Các trình tự được lọc và được phân tích như được mô tả trước đây (Koenig et al. J. Biol. Chem. 290:21773–21786, 2015), bằng cách loại bỏ tất cả các trình tự có nhiều hơn một đột biến trong vùng biến đổi, các trình tự có các đột biến không phù hợp với cách sử dụng codon suy biến *NNK* và các trình tự có các codon kết thúc. Mức làm giàu được tính toán bằng cách chia tần suất của một đột biến đã cho ở một vị trí đã cho trong mẫu đã phân loại cho tần suất của đột biến rất giống trong mẫu không được phân loại (thư viện ban đầu), như được mô tả trước đây (Fowler et al. Nat. Methods 7:741–746, 2010), bằng cách sử dụng công thức sau đây: $Ev = log_2((Rv,s/\sum Rx,s)/(Rv,i/\sum Rx,i))$, trong đó *Ev* là mức làm giàu của thể đột biến, *Rv,s* là số kết quả có đột biến *v* ở vị trí *s* trong quần thể được phân loại, *Rx,s* là số kết quả trong quần thể được phân loại có các đột biến ở vị trí giống như biến thể *Rv,s*, *Rv,i* là số kết quả của thể đột biến giống như *Rv,s* trong quần thể không được phân loại đầu vào và *Rx,i* là tổng của tất cả các biến thể trong quần thể không được phân loại đầu vào có các đột biến ở vị trí giống như biến thể *Rv,i*. Các điểm số *Ev* của các lần chọn lọc với FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno lần lượt được thể hiện ở các Bảng 9 và 10, và các khung màu xám thể hiện các đột biến không được nhận diện ở mẫu đã chọn lọc hoặc trong thư viện.

Bảng 11 thể hiện các đột biến có các điểm số bằng ít nhất là 0,5 trong các lần chọn lọc với FcRH5 của người và ít nhất là 0 trong các lần chọn lọc với FcRH5 của khỉ đuôi dài. Ở Bảng 11, các đột biến đã được chọn lọc để phân tích thêm (tức là, các đột biến mà ít nhất là được ưu tiên ở mức nhẹ về khả năng liên kết vào FcRH5 của người và tốt hơn ở mức trung bình về khả năng liên kết FcRH5 của khỉ đuôi dài) được bôi đậm bằng màu đen hoặc màu xám, và đột biến L29T được nhận diện bằng phương pháp giải trình tự Sanger được bôi đậm bằng màu xám. Tổng cộng 11 vị trí có các đột biến đáp ứng các tiêu chí này, với nhiều biến thể ở một số vị trí. Một vị tríđã có đột biến mà đưa vị trí glycosyl hóa (G54N) vào và không được chọn lọc để xác định đặc điểm thêm. Một biến thể khác, L29T, đã được nhận diện bằng cách sàng lọc bằng phương pháp giải trình tự Sanger nhưng chỉ không được nhận diện trong các dòng vô tính có đột biến S56T. Biến thể đó đã thể hiện mức cải thiện trung bình về ái lực là chỉ gấp 1,2 lần. Thể đột biến S56T có điểm số làm giàu âm mạnh là -2,1 (Bảng 9), cho thấy rằng đột biến L29T có thể có tác dụng có lợi mà bị làm lu mờ bởi sự có mặt của đột biến S56T thứ hai trong thể đột biến kép. Trong số chín vị trí còn lại, đột biến có điểm số cao nhất được chọn lọc ngoại trừ các vị trí 1 và 65, trong đó hai đột biến được chọn lọc. Các biến thể này được tạo ra bằng phương pháp tổng hợp ADN (GenWiz) và được biểu hiện ở dạng IgG1 của người kết hợp với chuỗi nhẹ của hu1G7.v1 (mà không có các đột biến trưởng thành ái lực) trong các tế bào Expi293 trong các môi trường nuôi cấy 1ml. Các biến thể IgG1 của người được tinh chế bằng phương pháp sắc ký protein A và được kiểm tra trong BIACORE® về ái lực. Trong số hai đột biến được kiểm tra, chỉ có hai, L29T và S100P, là có ảnh hưởng đáng kể đến ái lực khi được kiểm tra trong BIACORE® có FcRH5 tan được của người. Một mình đột biến L29T cải thiện ái lực trong bối cảnh đó gấp 2,2 lần, trong khi đó đột biến S100P đã cải thiện ái lực gấp 3 lần. Các đột biến này được kiểm tra ở dạng phân lập và ở dạng kết hợp trong bối cảnh chuỗi nhẹ đã trưởng thành ái lực có các đột biến I32L, A51G, T56S, và S94P có mặt trong hu1G7.v86. Chuỗi nặng L29T đã cải thiện ái lực của hu1G7.v86 gấp khoảng 2 lần, tương tự với tác dụng trong bối cảnh chuỗi nhẹ không có đột biến. Ngược lại, S100P, đột biến này trong bối cảnh chuỗi nhẹ không có đột biến đã cải thiện ái lực gấp 3 lần, cải thiện ái lực của hu1G7.v86 gấp 1,5 lần. Khi được kết hợp, các đột biến L29T và S100P đã cải thiện ái lực của

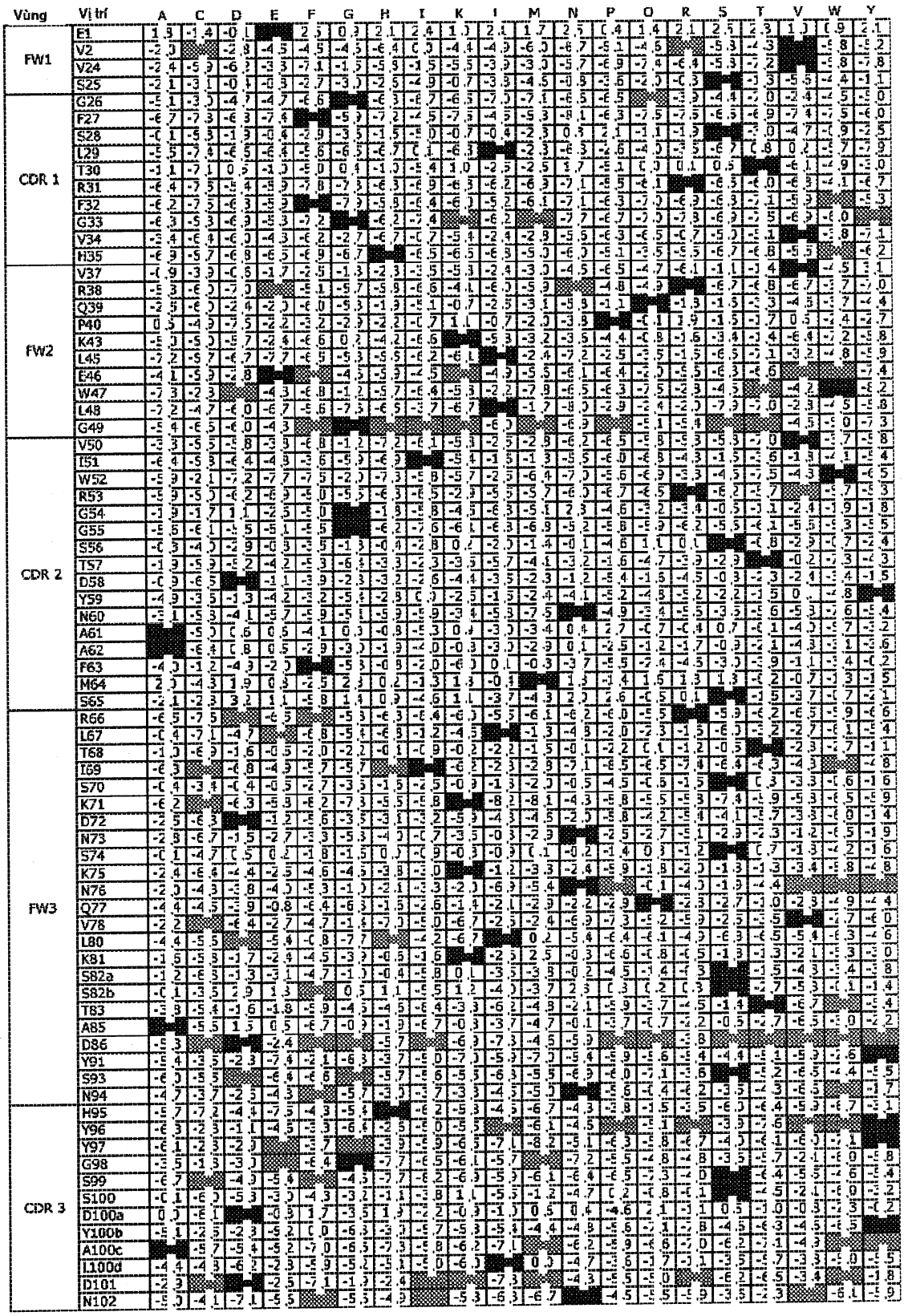
hu1G7.v86 gấp 2,5 lần. Do đó, ngay cả khi sử dụng kỹ thuật tìm kiếm chuyên sâu thông qua giải trình tự thế hệ tiếp theo và kiểm tra nhiều vị trí khung ngoài các vị trí CDR nhằm tìm ra các đột biến ưu tiên trong chuỗi nặng, thì cũng chỉ có thể đạt được mức cải thiện ái lực gấp 2,5 lần. Các kết quả này đã chỉ ra rằng các đột biến mà đóng góp đáng kể vào ái lực khi được kiểm tra một cách riêng biệt có ảnh hưởng ít hơn nhiều ở các phân tử đã có các đột biến khác. Điều này đặc biệt đúng với đột biến S100P trong chuỗi nặng mà, một cách riêng biệt, đã cải thiện ái lực của hu1G7.v1 gấp khoảng 3 lần nhưng trong bối cảnh phân tử có các đột biến chuỗi nhẹ I32L, A51G, T56S, và S94P và đột biến chuỗi nặng L29T thì có thêm một chút tác động nữa đến ái lực (Bảng 12, so sánh hu1G7.v91 và hu1G7.v93; trình tự hu1G7.v93 được trình bày ở Fig.7A-Fig.7B). Vì vậy, trong khi có thể đạt được các mức cải thiện ái lực đáng kể bằng cách bổ sung một vài đột biến vào chuỗi nhẹ, thì chỉ có thể đạt được mức cải thiện tương đối thấp khi đưa các đột biến vào chuỗi nặng.

Bảng 9. Các điểm số về mức làm giàu của các đột biến trong hu1G7.v1 được chọn lọc với FcRH5 của người

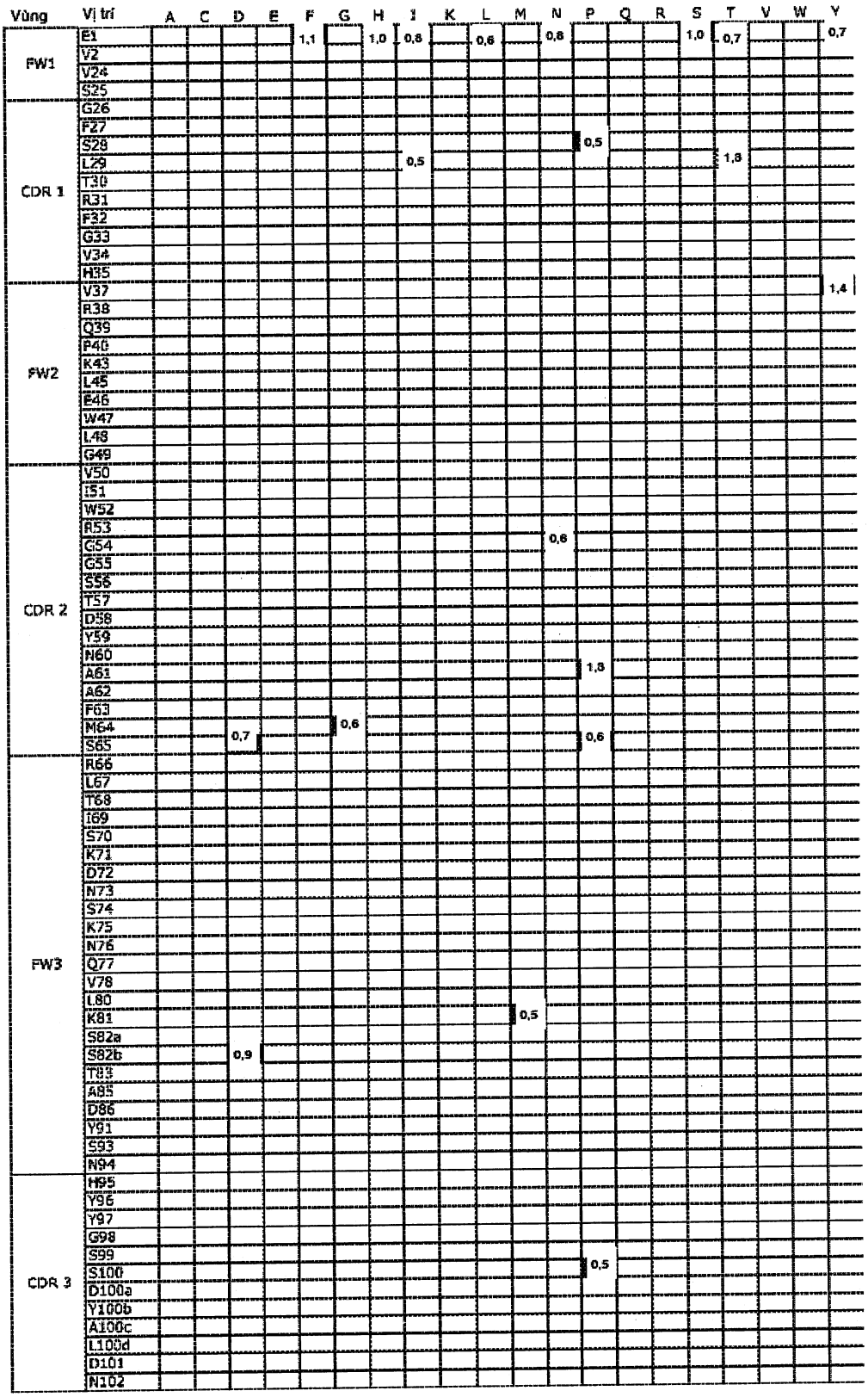


Vùng	Vị trí	A	C	D	E	F	G	H	I	K	L	M	N	P	Q	R	S	T	V	W	Y
FW1	E1	0,0	-1,4	-1,3		-1,1	-0,5	1,0	0,8	-0,7	0,8	0,1	0,8	-2,1	-0,1	0,3	1,0	0,7	-0,7	0,1	0,7
	V2	-2,8	-6,0	-3,5	-6,2	-5,2	-4,8	-6,4	-1,1		-4,7	-9,0	-6,7	-5,4	-5,6	-6,8	-5,0	-5,2		-7,8	-4,9
	V24	-3,1	-6,9	-7,6	-4,1	-6,5	-2,0	-6,0	-2,4	-6,9	-4,5	-3,6	-7,3	-6,9	-5,4	-8,5	-6,7	-6,2	-4,4	-5,2	-7,7
	S25	-2,6	-3,7	-2,5	-1,1	-2,1	-3,6	-3,4	-4,1	-2,1	-3,2	-3,3	-2,0	-4,1	-2,0	-1,4	-4,4	-1,9	-4,4	-2,9	-1,0
CDR 1	G26	-5,1	-3,2	-5,3	-5,1	-8,6		-7,3	-8,7	-6,9	-6,1	-5,8	-7,1	-7,5	-6,1	-3,9	-4,3	-5,8	-2,4	-5,4	-5,3
	F27	-6,7	-6,5	-9,2	-7,1		-6,9	-6,6	-6,5	-6,1	-5,2	-6,1	-6,1	-8,5	-6,9	-6,5	-8,5	-6,4	-6,1	-8,2	-6,6
	S28	-0,5	-4,5	-3,4	-1,2	-2,1	-3,6	-1,9	-4,1	-0,1	-0,1	-2,2	-0,8	0,5	-0,9	-1,0		-3,1	-3,7	-0,7	-1,8
	L29	-5,7	-6,3	-6,8	-6,6	-6,0	-6,2	-5,9	0,5	-6,7		-2,6	-6,6	-3,2	-3,8	-3,7	-6,4	1,3	0,4	-6,7	-7,9
	T30	-2,2	-6,1	-1,8	-2,6	-5,4	-1,2	-2,7	-5,0	-0,1	-3,3	-2,6	-0,2	-5,7	-1,5	-0,7	-0,9		-6,5	-3,4	-3,5
	R31	-6,7	-6,2	-8,2	-5,7	-8,2	-5,7	-7,3	-7,3	-6,1	-6,8	-7,9	-6,8	-7,1	-5,9		-6,4	-6,4	-6,5	-5,5	-6,3
	F32	-6,9	-7,5	-6,7	-6,4		-7,5	-6,2	-5,4	-7,2	-5,8	-6,8	-7,0	-7,9	-7,6	-7,2	-6,8	-7,4	-5,7	-8,1	-6,4
	G33	-5,9	-6,7	-7,9	-6,9	-8,2		-8,0	-7,4	-6,8	-7,8		-8,1	-7,2	-5,7	-8,0	-7,5	-8,9	-6,3	-7,0	-6,6
	V34	-4,0	-6,9	-6,6	-4,2	-7,0	-3,2	-6,1	-1,8	-5,9	-2,9	-3,2	-3,8	-7,9	-7,0	-5,1	-6,1	-6,1		-5,0	-6,3
	H35	-7,9	-7,0	-7,7	-6,5	-7,9	-6,1		-7,1	-6,6	-8,2	-6,5	-9,8	-5,3	-4,2	-8,0	-5,9	-7,0	-8,0		-6,5
FW2	V37	-0,8	-4,8	-2,2	-1,7	-4,0	-1,5	-2,4	-4,7	-4,5	-2,7	-3,2	-1,4	-5,5	-2,8	-8,1	-0,2	0,1		-3,3	1,4
	R38	-8,2	-6,9	-7,0	-5,9	-5,8	-5,8	-6,8	-6,6	-4,0	-5,7	-6,3	-6,8	-5,8	-4,9		-5,4	-6,5	-6,1	-4,7	-5,7
	Q39	-0,3	-6,0	-0,7	-1,3	-5,0	-4,1	-2,4	-4,1	-1,4	-2,8	-3,7	-4,4	-1,5		-2,0	-0,3	-3,3	-4,2	-1,3	-3,4
	P40	-1,5	-5,1	-5,5	-1,7	-3,8	-3,0	-2,3	-2,4	-0,9	-2,3	-3,0	-3,8		-1,0	-0,2	-1,0	-2,9		-1,9	-2,9
	K43	-4,3	-6,1	-4,9	-2,3	-4,2	-1,8	-4,6	-5,2		-5,0	-3,2	-3,9	-5,1	-1,3	-2,2	-2,8	-1,8	-5,1	-4,3	-4,4
	L45	-6,0	-6,4	-5,4	-6,3	-6,3	-5,2	-5,9	-4,5	-6,0		-2,8	-8,7	-2,8	-4,0	-1,9	-6,7	-5,9	-3,2	-5,1	-6,0
	E46	-5,7	-6,9	-3,5			-5,8	-6,9		-7,4	-6,7		-6,2	-6,7	-2,2	-6,6	-3,9	-6,0			-5,2
	W47	-5,1	-2,5	-5,5	-5,2	-5,6	-1,6	-6,4	-5,1	-7,2	-2,7	-6,2	-6,8	-6,5	-5,9	-3,1	-5,1	-5,8	-4,7		-5,6
	L48	-5,5	-5,1	-6,6	-7,6	-6,0	-6,0	-6,2	-4,2	-6,7	-2,0	-2,0	-5,4	-3,4	-3,3	-2,8	-7,1	-6,7	-2,7	-5,7	-5,5
	G49	-4,8	-6,0	-6,9	-4,8		-6,0	-7,2	-5,1	-6,7	-6,6		-8,3	-7,0	-5,5	-5,8	-5,8	-8,9	-5,1	-4,7	-6,7
CDR 2	V50	-3,2	-6,9	-5,8	-3,5	-6,6	-1,3		-6,2	-7,6	-2,9	-3,1	-6,6		-7,8	-5,8	-7,2	-6,7		-3,8	-6,6
	I51	-4,9	-5,2	-5,9	-4,8	-3,6	-5,3	-6,1		-5,7	-2,0	-1,9	-5,3	-8,3	-8,2	-4,7	-1,9	-3,1	-2,5	-4,7	-5,5
	W52	-7,6	-2,3	-7,4	-8,5	-5,6	-2,5	-6,8	-6,8	-5,6	-3,2	-5,8	-6,7	-6,1	-6,5	-3,5	-5,2	-7,5	-5,8		-6,3
	R53	-6,6	-4,4	-7,0	-6,7	-7,0	-5,6	-6,5	-6,4	-5,9	-6,9	-6,1	-6,5	-7,4	-6,2		-5,9	-6,2	-6,4	-5,7	-6,3
	G54	-3,1	-1,8	0,1	-1,7	-3,5		-2,8	-5,4	-4,1	-5,2	-6,1	0,6	-4,9	-4,2	-3,4	-1,7	-2,8	-3,2	-1,4	-1,2
	G55	-5,2	-5,9	-5,6	-5,3	-7,8		-5,8	-7,0	-5,6	-6,1	-6,2	-5,0	-8,0	-5,6	-5,4	-5,3	-6,0	-5,8	-4,6	-6,1
	S56	-1,3	-4,3	-3,5	-2,2	-3,7	-2,8	-0,8	-3,2	-1,9	-2,8	-2,5	-2,1	-3,9	-0,4	-1,4	-2,8	-2,1	-3,3	-1,5	-2,9
	T57	-2,2	-5,7	-4,7	-3,7	-4,1	-4,9	-2,9	-2,0	-3,1	-4,8	-3,7	-3,4	-1,8	-2,3	-3,1	-2,8	-3,9	-2,7	-2,2	-2,3
	D58	-1,4	-5,9		-1,5	-2,6	-2,8	-3,4	-2,9	-4,9	-4,1	-2,9	-1,9	-5,7	-3,3	-4,7	-1,4	-3,9	-2,7	-2,2	-1,5
	Y59	-4,8	-3,9	-1,5	-3,8	-3,4	-5,1	-2,9	-1,4	-3,4	-2,2	-1,7	-4,4	-6,0	-4,3	-4,4	-2,5	-2,2	-1,4	-5,0	
	N60	-4,0	-6,8	-3,5	-4,8	-5,9	-4,0	-3,8	-6,5	-3,5	-5,7	-5,7		-5,0	-5,9	-6,1	-3,3	-5,7	-5,4	-6,0	-5,2
	A61		-6,0	-0,6	-0,2	-3,9	-1,3	-2,5	-4,7	-0,6	-3,3	-3,1	-1,0	1,3	-2,2	-1,0	-1,0	-1,2	-3,5	-4,9	-2,4
	A62		-5,8	-0,3	-0,5	-3,9	-3,2	-2,9	-4,2	-1,0	-2,1	-2,9	-1,3	-4,0	-2,0	-2,2	-0,7	-3,0	-4,6	-2,3	-2,0
	F63	-4,2	-1,5	-3,9	-1,0		-4,5	-2,3	-2,1	-4,4	-0,8	-1,3	-3,4	-5,5	-2,4	-5,5	-2,4	-3,8	-1,3	-3,3	-0,8
	M64	-0,2	-4,7	0,0	-0,7	-3,1	0,9	-1,4	-2,1	-0,3	-1,2		-0,3	-2,1	-0,4	-0,7	-0,5	-1,8	-2,1	-1,7	-2,5
	S65	-3,3	-3,1	0,7	-0,8	-6,2	-0,1	-0,4	-7,2	0,0	-4,1	-4,8	0,3	0,8	-1,5	-0,5		-2,8	-5,5	-0,3	-1,9
FW3	R66	-6,0	-6,0	-6,2	-5,7	-5,8	-5,5	-6,2	-6,4	-5,5	-6,3	-5,6	-5,7	-5,6	-5,2	-5,9	-5,2	-5,7	-5,5		-6,2
	L67	-2,3	-6,1	-4,5	-5,0	-5,4	-6,4	-5,8	-2,3	-4,8		-1,8	-4,5	-2,8	-2,7	-2,3	-4,8	-3,4	-3,8		-5,2
	T68	-1,2	-4,4	-2,4	-1,5	-2,8	-2,8	-0,8	-1,4	-1,1	-2,1	-2,6	-1,1	-2,8	-0,7	-1,5	-1,1	-3,2	-2,9	-3,0	-1,3
	T69	-5,7	-7,2	-7,8		-5,4	-7,7		-7,2	-7,2	-3,2	-2,7	-6,1	-7,4	-5,5	-8,0	-7,1	-8,2	-5,1	-5,1	-7,3
	S70	-1,7	-2,7	-1,2	-1,0	-2,2	-2,8	-1,8	-2,6	-1,1	-2,6	-2,7	-1,4	-6,1	-1,8	-1,8	-7,0	-1,1	-3,2	-1,2	-1,7
	K71	-7,2	-8,0	-8,2	-5,5	-5,2	-8,7	-5,8	-8,8		-8,0	-5,8	-4,4	-7,4	-8,1	-5,8	-7,0	-8,6	-6,8	-8,5	-8,6
	D72	-2,9	-5,1		-1,3	-5,4	-4,1	-3,3	-4,0	-5,1	-4,8	-5,7	-1,8	-6,0	-4,6	-6,0	-3,9	-4,7	-3,1	-3,8	-1,7
	N73	-3,5	-5,1	-3,4	-2,9	-3,7	-4,8	-4,4	-1,3	-3,6	-1,8	-3,2		-3,5	-3,5	-4,4	-4,1	-3,3	-2,3	-5,7	-1,9
	S74	-1,0	-5,7	-1,8	-1,1	-1,5	-2,0	-1,3	-1,0	-0,4	-1,9	-1,3	-1,0	-1,4	-1,1	-1,2	-2,4		-0,4	-2,9	-2,1
	K75	-3,0	-5,1	-5,1	-2,6	-5,6	-8,6	-4,1	-3,5		-2,6	-3,2	-3,0	-5,7	-3,2	-2,4	-3,1	-2,5	-2,9	-5,5	-4,9
	N76	-3,7	-5,2	-4,2	-1,5	-5,8	-3,8	-2,8	-5,8	-1,3	-5,3	-5,1	-3,0	-5,4	-0,2	-2,4	-1,8	-3,6		-2,8	-3,9
	Q77	-4,1	-4,8	-5,1	-1,9	-5,8	-6,2	-2,2	-3,2	-2,0	-2,7	-3,8	-8,0	-3,1		-3,3	-3,0	-2,5	-3,0	-3,6	-4,3
	V78	-2,4	-5,8	-5,0	-3,2	-4,8	-1,5	-5,9	-6,4	-6,4	-3,1	-2,8	-3,0	-5,3	-5,9	-5,5	-2,8	-3,0		-3,7	-5,7
	L80	-3,5	-7,3	-6,9	-5,6	-1,6	-7,1	-5,9	-4,3	-7,1		-1,1	-7,8	-6,4	-5,8	-8,9	-8,0	-7,1	-4,6		-5,3
	K81	-2,0	-5,2	-2,8	-2,8	-3,5	-3,7	-0,5	-3,2		-3,2	-3,7	-1,8	-6,2	-1,7	-1,7	-2,4	-2,9	-3,1	-3,9	-2,4
	S82a	-2,6	-4,0	-1,9	-3,9	-4,4	-1,9	-1,6	-4,8	-1,0	-2,1	-4,0	-1,3	-4,8	-1,7	-0,9		-2,6	-4,2	-3,9	-3,0
	S82b	-1,9	-4,0	0,9	0,4	-5,5	-0,8	-0,4	-6,1	-0,1	-3,2	-4,9	0,2	-0,8	-1,0	-0,6	-3,9	-3,3	-3,7	0,0	-1,9
	T83	-3,7	-6,4	-2,7	-1,7	-5,0	-4,7	-3,9	-4,9	-3,2	-4,1	-3,4	-2,7	-4,1	-1,7	-3,9	-2,3	-1,3	-4,3	-3,5	-4,2
	A85		-5,0	-0,2	-0,4	-4,2	-1,5	-2,2	-5,3	-1,8	-3,0	-3,7	-1,0	-5,1	-1,7	-2,3	-1,3	-3,6	-4,3	-1,2	-2,0
	D86							-6,7		-7,9	-6,7			-6,1	-5,8		-6,4	-6,4	-6,2	-4,2	-6,8
	Y91	-5,9	-3,8	-2,9	-5,4	-2,3	-5,9	-3,5	-6,0	-7,6	-5,3	-4,9	-4,6	-5,9	-5,2	-4,2	-4,7	-4,7	-5,0	-2,6	
	S93	-6,9	-6,5	-7,7		-5,6	-6,4		-7,0	-6,9	-7,2	-7,4	-8,2	-6,8	-6,1	-4,4	-5,8	-5,8	-5,8	-5,9	-7,5
	N94	-5,2	-5,5	-3,2	-4,9			-3,2	-4,3	-3,7	-5,0	-5,4		-5,8	-0,7	-8,1	-3,8	-4,0	-6,6	-5,2	-2,7
CDR 3	H95	-8,4	-5,2	-4,6	-7,5	-6,6	-6,4		-8,2	-8,2	-4,9	-6,4	-4,5	-3,9	-1,9	-4,1	-6,8	-6,4		-5,6	-3,6
	Y96	-7,2	-2,1	-1,5	-4,6	-3,8	-5,8	-3,3	-6,8	-6,0	-6,4	-8,1	-5,1	-6,9	-5,1		-4,9	-6,2	-6,4	-5,2	
	Y97	-6,2	-3,3	-2,9	-3,9	-4,3	-5,2	-4,4	-7,1	-8,0	-6,6	-9,2	-5,7	-6,8	-6,4	-8,2	-4,4	-6,5	-7,3	-7,1	
	G98	-5,2	-2,1	-3,2	-6,3	-5,2		-6,1	-6,5	-5,9	-7,1	-7,6	-7,0	-6,9	-6,0	-8,0	-4,3	-7,1	-2,6	-5,4	-6,0
	S99	-6,7	-5,0		-6,4	-7,3	-6,8	-7,7	-8,2	-7,4	-7,9	-6,6	-6,2	-7,1	-8,3	-4,8		-6,1	-6,1		-6,4
	S100	-3,0	-5,6	-4,5	-0,8	-4,4	-5,5	-5,2	-5,0	-7,4	-5,6	-2,8	-5,9	0,5	-3,4	-4,1		-4,4	-4,5	-5,9	-5,0
	D100a	-5,0	-7,1		-2,1	-4,5	-4,2	-4,0	-8,7	-5,0	-8,1	-4,9	-3,2	-5,9	-4,8	-6,0	-5,2	-5,7	-4,3	-6,4	-2,9
	Y100b	-6,3	-2,4	-3,0	-5,2	-0,5	-6,5	-3,8	-8,6	-4,8	-8,1	-5,1	-4,3	-6,6	-9,1	-5,8	-4,3	-5,6	-5,4	-5,9	
	A100c		-5,7	-7,4	-8,2	-5,9	-7,6	-8,7	-8,0	-8,8	-8,1	-7,8	-7,8	-8,9		-7,9	-8,6	-8,7	-7,5	-8,8	-7,3
	L100d	-4,3	-5,8	-5,4	-2,7	-5,7	-5,7	-4,9	-8,2	-5,5		0,0	-5,1	-3,4	-2,5	-1,5	-3,9	-5,9	-4,2	-8,6	-8,2
	D101	-3,7			-2,7	-7,1	-2,7	-4,1	-7,6	-8,1	-6,3	-7,3	-4,1	-5,9	-4,9	-7,1	-7,8		-3,5		-2,4
	N102	-5,4		-6,5	-5,8	-5,1	-6,3	-6,3		-5,5	-6,7	-5,3		-6,8	-7,1	-6,4	-4,2	-2,2	-8,0	-5,5	-7,5

Bảng 10. Các điểm số về mức làm giàu của các đột biến trong hu1G7.v1 được chọn lọc với FcRH5 của khỉ đuôi dài



Bảng 11. Các đột biến có điểm số về mức làm giàu bằng ít nhất là 0,5 trong các lần chọn lọc với FcRH5 của người (Bảng 9) và điểm số về mức làm giàu bằng ít nhất là 0 trong các lần chọn lọc với FcRH5 của khỉ đuôi dài (Bảng 10)



Bảng 12. Ái lực của các biến thể hu1G7 có các đột biến được nhận diện bằng phương pháp giải trình tự sâu các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn được chọn lọc với FcRH5

Biến thể	Các đột biến (vị trí Kabat)		K_D (nM)	Mức cải thiện gấp mấy lần so với:	
	Chuỗi nặng	Chuỗi nhẹ		hu1G7.v1	hu1G7.v86
hu1G7.v1	-	-	14,6	-	
A	E1S	-	14,6	1,0	
B	E1F	-	19,1	0,8	
C	S28P	-	13,3	1,1	
D	L29T	-	6,7	2,2	
E	V37Y	-	11,0	1,3	
F	A61P	-	11,7	1,2	
G	M64G	-	14,4	1,0	
H	S65D	-	15,0	1,0	
I	S65P	-	16,2	0,9	
J	K81M	-	15,3	1,0	
K	S82bD	-	15,0	1,0	
L	S100P	-	4,8	3,0	
hu1G7.v85	M64V	S30R, I32L, A51G, T56S, S94P	0,8	17,0	
hu1G7.v86	M64V	I32L, A51G, T56S, S94P	1,4	10,3	
hu1G7.v91	M64V, L29T	I32L, A51G, T56S, S94P	0,7	20,9	2,0
hu1G7.v92	M64V, S100P	I32L, A51G, T56S, S94P	0,9	15,9	1,5
hu1G7.v93	M64V, L29T, S100P	I32L, A51G, T56S, S94P	0,6	25,3	2,5

Ví dụ 3. Tạo và xác định đặc điểm *in vitro* của FcRH5 TDB làm ví dụ

Các kháng thể kháng FcRH5 được mô tả trong bản mô tả này được sử dụng để tạo ra các kháng thể đặc hiệu kép phụ thuộc vào tế bào T (TDB) bao gồm các thể quyết định liên kết của kháng thể kháng FcRH5 của người ở một nhánh và kháng thể kháng CD3ε của người ở nhánh kia. Các thể quyết định liên kết FcRH5 bao gồm các dòng vô tính kháng thể đơn dòng đã được làm trưởng thành ái lực và biến đổi giống như của người 1G7, 1G7.v85, và 1G7.v87. Các thể quyết định liên kết được biến đổi

giống như của người dùng cho kháng thể kháng CD3ε bao gồm dòng vô tính kháng thể ái lực cao 38E4.v1, dòng vô tính ái lực cao 38E4.v11, và dòng vô tính ái lực thấp 40G5 (EC50 của hCD3ε lần lượt = 1,0nM, 50pM, và 13nM). Dòng vô tính kháng thể kháng CD3 38E4.v1, 38E4.v11, và 40G5c liên kết polypeptit CD3ε của người (một mảnh polypeptit CD3ε của người gồm các axit amin 1-26 hoặc 1-27 (SEQ ID NO: 174)) và gốc axit amin Glu5 của CD3ε là không cần có cho quá trình liên kết (xem thêm Công bố đơn PCT số WO 2015/095392 và Công bố đơn sáng chế Mỹ số 2015-0166661, mỗi trong số các tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn).

FcRH5 TDB làm ví dụ được xác định đặc điểm để đánh giá tiềm năng trị liệu của chúng. Các phân tử FcRH5 TDB có chiều dài đầy đủ đã được biến đổi giống như của người được phát hiện ra là có tác dụng tiêu diệt các tương bào của người và các tế bào khối u u tủy nguyên phát lấy từ bệnh nhân ở các liều lượng cực kỳ thấp (pM) và khởi phát sự tăng sinh mạnh mẽ của các tế bào T. FcRH5 TDB hiệu nghiệm trong việc ức chế sự tăng trưởng của các dạng dị ghép u tủy *in vivo* và dẫn đến tiêu tan hoàn toàn tế bào B và tương bào ở động vật linh trưởng ở các mức liều lượng được dung nạp tốt mà được mong đợi là làm bão hòa đích. Mức tiêu tan tương bào hoàn toàn này cung cấp bằng chứng thuyết phục về độ hiệu nghiệm trong vi môi trường tủy xương. Hoạt tính của FcRH5 TDB tương quan với mức biểu hiện đích (ví dụ, biểu hiện FcRH5) cho thấy rằng các bệnh nhân u tủy nguy cơ cao có sự tăng bản sao nhiễm sắc thể 1q có thể chỉ nhạy duy nhất với liệu pháp miễn dịch này.

Vật liệu và phương pháp

A. Các kháng thể

a. Sản xuất TDB

1. Phương pháp Rational Design

Để tối ưu hóa mức biểu hiện và làm tăng sản lượng TDB, thì các đột biến được xử lý kỹ thuật vào các miền Fc, VH, VL, CH1, và CL của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB) để định hướng quá trình tạo monome kháng thể thích hợp. Cụ thể là, các cải biến axit amin mà đưa các vùng mang điện tích vào các miền VH, VL, CH1, và/hoặc CL đã tạo ra cơ chế làm giảm sự ghép cặp sai của

chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Các vùng mang điện tích cùng gốc có điện tích toàn phần đối ngược được định hướng cùng nhau và trợ giúp việc ghép cặp chính xác chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, làm tăng tổng sản lượng sản xuất của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB). Các dạng kết cấu theo Rational Design làm ví dụ, bao gồm các cải biến axit amin của các miền Fc, VH, VL, CH1, và CL, được trình bày ở Fig.1A-Fig.1B.

2. Phương pháp Rosetta Design

Ngoài ra, hoặc theo cách khác, để tối ưu hóa mức biểu hiện và làm tăng sản lượng TDB, thì các đột biến được xử lý kỹ thuật vào các miền Fc, VH, VL, CH1, và CL của kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, FcRH5 TDB) để định hướng quá trình tạo monome kháng thể thích hợp. Phương pháp Rosetta Design đã đem lại cơ chế phụ thêm để thúc đẩy sự ghép cặp chính xác chuỗi nặng và chuỗi nhẹ, ngoài các đột biến vùng mang điện tích ra, dưới dạng đột biến chốt và đột biến lỗ ở các miền CH1 và CL. Các dạng kết cấu theo Rosetta Design làm ví dụ, bao gồm các cải biến axit amin của các miền Fc, VH, VL, CH1, và CL, được trình bày ở Fig.1C-Fig.1F.

3. Phương pháp một tế bào dùng cho việc tạo ra FcRH5 TDB

Theo một phương pháp, FcRH5 TDB có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy các tế bào chủ đã được đồng chuyển nhiễm bằng hai plasmit, mỗi loại mã hóa một nhánh trong số hai nhánh của FcRH5 TDB (ví dụ, plasmit thứ nhất mã hóa kháng thể một nửa kháng FcRH5 và plasmit thứ hai mã hóa kháng thể một nửa kháng CD3). Quá trình chuyển nhiễm các tế bào chủ (ví dụ, tế bào vi khuẩn, tế bào động vật có vú, hoặc tế bào côn trùng) được thực hiện ở dạng thức đĩa 96 lỗ. Để sàng lọc về mức sản xuất FcRH5 TDB, xấp xỉ 2.000 đến 3.000 dòng vô tính có thể được chọn và được đánh giá bằng ELISA và phương pháp huỳnh quang phân giải theo thời gian thuần nhất (homogeneous time resolved fluorescence-HTRF) với IgG nguyên vẹn về khả năng của chúng trong việc liên kết kháng nguyên đích, FcRH5. Các dòng vô tính tạo ra FcRH5 TDB có khả năng liên kết vào FcRH5, hoặc một mảnh của nó, được chọn lọc để mở rộng và sàng lọc thêm (ví dụ, về khả năng liên kết vào CD3). Sau đó, các dòng vô tính đứng đầu có thể

được chọn lọc để phân tích thêm dựa trên các kháng thể đặc hiệu kép (bsAb) theo phần trăm đã tạo ra, độ chuẩn, và định tính hiệu suất (performance qualification-PQ).

Một phương pháp một tế bào làm ví dụ mà có thể được sử dụng để tạo ra FcRH5 TBD theo sáng chế được mô tả trong Đơn yêu cầu cấp bằng độc quyền sáng chế Quốc tế số PCT/US16/28850, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn.

4. Phương pháp hai tế bào dùng cho việc tạo ra FcRH5 TDB

Theo cách khác, FcRH5 TDB có thể được tạo ra bằng cách nuôi cấy các hemime kháng thể (ví dụ, các kháng thể một nửa) một cách tách biệt (tức là, trong hai dòng tế bào khác nhau) bằng cách sử dụng kỹ thuật lên men mật độ tế bào cao và sau đó, phân lập từng kháng thể một nửa này một cách độc lập bằng phương pháp sắc ký protein A. Sau đó, có thể kết hợp các kháng thể một nửa đã được tinh chế, ví dụ, ở tỷ lệ mol 1:1 và được ủ trong Tris 50mM, độ pH = 8,5 khi có mặt DTT 2mM trong 4 giờ để cho phép gắn và khử các disulfua trong vùng bản lề. Quá trình thẩm tách dựa trên cùng một dung dịch đệm nhưng không có DTT trong 24-48 giờ dẫn đến việc tạo thành các liên kết disulfua liên chuỗi.

Các TDB có thể được tạo ra theo cách khác bằng kỹ thuật chuyển nhiễm hai plasmit, mỗi loại mã hóa các nhánh riêng biệt của TDB, vào các tế bào chủ tách biệt. Các tế bào chủ này có thể được nuôi cấy đồng thời hoặc nuôi cấy tách biệt. Quá trình chuyển nhiễm các tế bào chủ có thể được thực hiện ở dạng thức đĩa 96 lỗ. Để sàng lọc về mức sản xuất TDB, 2.000 đến 3.000 dòng vô tính được chọn và được đánh giá bằng ELISA và phương pháp huỳnh quang phân giải theo thời gian thuần nhất (HTRF) IgG nguyên vẹn về khả năng của chúng trong việc liên kết kháng nguyên đã chọn (ví dụ, FcRH5). Các dòng vô tính tạo ra TDB có khả năng liên kết vào FcRH5, hoặc một mảnh của nó, được chọn lọc để mở rộng và sàng lọc thêm. Các dòng vô tính đứng đầu được chọn lọc để phân tích thêm dựa trên các kháng thể đặc hiệu kép (bsAb) theo phần trăm đã tạo ra, độ chuẩn, và PQ.

5. Các phương pháp sản xuất làm ví dụ

Theo một ví dụ, bằng cách sử dụng chiến lược này, FcRH5 TDB được sản xuất ra bằng chiến lược đồng nuôi cấy bằng cách sử dụng các tế bào *E. coli* biểu hiện một kháng thể một nửa (lỗ) và các tế bào *E. coli* biểu hiện kháng thể một nửa thứ hai (chốt) được cho sinh trưởng cùng nhau trong các bình phản ứng có bộ lắc ở tỷ lệ được xác định trước sao cho nó tạo ra các lượng tương tự của từng kháng thể một nửa (xem tài liệu: Spiess et al. *Nat. Biotechnol.* 31(8):753-8, 2013; Công bố đơn PCT số WO 2011/069104, tài liệu này được đưa toàn bộ vào đây bằng cách viện dẫn). Sau đó, thu hoạch chất dịch vi khuẩn đã được đồng nuôi cấy, các tế bào bị phá vỡ trong thiết bị tạo chất lưu hiển vi và các kháng thể được tinh chế bằng ái lực Protein A. Đã quan sát thấy rằng trong suốt quá trình tạo chất lưu hiển vi và bắt protein A, hai nhánh này đã gắn và tạo ra các liên kết cầu disulfua liên chuỗi vùng bản lề.

Theo một ví dụ khác, các kháng thể đặc hiệu kép có chiều dài đầy đủ được sản xuất như được mô tả trước đây (Junttila et al. *Cancer Res.* 74:5561-5571, 2014; Sun et al. *Science Trans. Med.* 7:287ra270, 2015). Nói một cách ngắn gọn, hai kháng thể một nửa (ví dụ, kháng thể kháng FcRH5 (ví dụ, các biến thể được tối ưu hóa của 1G7) và kháng thể kháng CD3 (ví dụ, 38E4.v1)) chứa các đột biến "chốt" hoặc "lỗ" trong các miền CH3 của chúng được biểu hiện bằng cách chuyển nhiễm nhất thời các tế bào CHO và sau đó, được tinh chế ái lực bằng Protein A. Các lượng ngang bằng của hai kháng thể một nửa được ủ với lượng dư 200 mol của glutathion đã khử ở độ pH = 8,5 qua đêm ở 32°C để định hướng quá trình tạo thành các liên kết disulfua chốt-lỗ. Kháng thể đặc hiệu kép đã được lắp ráp (ví dụ, FcRH5 TDB) được tinh chế từ các chất gây bẩn thông qua sắc ký tương tác kỵ nước. FcRH5 TDB đã được tinh chế được xác định đặc điểm về độ tinh khiết bằng phép đo phổ khối, sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC), và điện di trên gel.

b. Quá trình tinh chế FcRH5 TDB

FcRH5 TDB được tinh chế từ các chất gây bẩn bằng sắc ký tương tác kỵ nước (HIC). Vật liệu thu được được phân tích về các mức nội độc tố bằng cách sử dụng hệ thống xét nghiệm di động Endosafe, và, khi cần thiết, hàm lượng nội

độc tố này được làm giảm bằng cách rửa protein với Triton X-114 0,1%. Phân tử lượng của các TDB được phân tích bằng phép đo phổ khối (LC- ESI/TCF) như được mô tả trước đây (Jackman et al. *The Journal of Biological Chemistry*. 285:20850-9, 2010). FcRH5 TDB cũng được phân tích bằng sắc ký loại trừ theo kích cỡ phân tích trên cột Zenix SEC-300 (Sepax Technologies Mỹ) bằng cách sử dụng hệ thống HPLC 1:100 của Agilent. Sự có mặt của các mảnh kháng thể tồn dư được định lượng bằng kỹ thuật điện di bằng cách sử dụng Thiết bị Phân tích Sinh học Bioanalyzer 2100 và Chip Protein 230.

c. Các kháng thể được đánh dấu

Tất cả các kháng thể đã được đánh dấu một cách trực tiếp để dùng cho phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy, ngoại trừ các kháng thể được đề cập khác đi, được mua từ BD Bioscience. Kháng thể PD-1 kháng người được mua từ Affymetrix. IgG của dê kháng người và IgG của dê kháng chuột nhắt được mua từ Jackson Immunoresearch. Kháng thể kháng PC-FITC (dòng vô tính Vs38c) được mua từ DAKO. Kháng thể SLP-76 dùng cho phương pháp thấm tách phương Tây được mua từ Cell Signaling Technology. Kháng thể p-SLP76 (Ser376) được tạo ra ở Genentech, Inc.

Để phát hiện ra FcRH5 từ các mẫu đa u tủy (MM) và huyết tương của đối tượng cho khỏe mạnh và các tế bào B bằng FACS, thì kháng thể kháng FcRH5 1G7 được đánh dấu bằng PE bởi Southern Biotec. Đối với phương pháp soi kính hiển vi, các TDB được đánh dấu bằng Alexa Fluor 647 bằng cách sử dụng bộ kit đánh dấu protein thích hợp (ThermoFisher) theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các TDB được thẩm tách vào PBS, độ pH = 7,2 trước khi đánh dấu và thường đạt được tỷ lệ thuốc nhuộm/protein là ~4.

B. Các thử nghiệm về tính ổn định phân tử

Để đánh giá tính ổn định phân tử của FcRH5 TDB, các xét nghiệm ứng suất nhiệt được thực hiện ở 30°C đến 40°C trong bốn tuần. FcRH5 TDB được ủ ở mức 1mg/ml trong his-axetat 20mM, sucroza 240mM, độ pH = 5,5, và được đánh giá sau 2 tuần. Các TDB được đánh giá về mức thay đổi <5% đối với sự khử amin N/đồng phân hóa D, về mức thay đổi <2,5% đối với sự mất monome bằng SEC, và về mức

<16% đối với sự mất đỉnh chính bằng IEC ở thời điểm 2 tuần. Dung dịch đệm SEC được sử dụng là KCl 0,25M, K_3PO_4 0,2M, độ pH = 6,3. LC-MS được thực hiện trong điều kiện khử bằng cách sử dụng TCEP ở 60°C trong 10 phút. Phép phân tích LC-MS/MS được thực hiện bằng phương pháp lập bản đồ peptit trypsin RCM có khử DTT, bịt đầu mút IAA, và phân giải độ pH = 8,2.

Thử nghiệm oxy hóa AAPH được thực hiện để đánh giá mức oxy hóa Trp <35% và Met Ox/Met_{256} <1,1. FcRH5 TDB được ủ ở nồng độ là 1,0mg/ml và được tạo ứng suất trong AAPH 1mM trong 16 giờ. Thử nghiệm oxy hóa bằng ánh sáng cũng được thực hiện để đánh giá Trp OX/TrpOX_ApoMabW53 >0,5. Đối với thử nghiệm oxy hóa bằng ánh sáng, các TDB được ủ ở nồng độ là 1,0mg/ml trong 48 giờ và được cho tiếp xúc với ánh sáng trong 2,4 triệu lux giờ. Mức oxy hóa được đánh giá bằng phép phân tích LC-MS/MS với phương pháp lập bản đồ peptit trypsin RCM có khử DTT, bịt đầu mút IAA, và phân giải độ pH = 8,2.

C. Nuôi cấy tế bào và tạo dòng tế bào ổn định

Các tế bào HEK-293T và HEK-T biểu hiện phức hợp 1G4 TCR và các hợp phần truyền tín hiệu TCR cốt yếu (James et al. *Nature* 487:64-69, 2012) được nuôi cấy trong DMEM (Sigma Aldrich). Tất cả các dòng tế bào khác được nuôi cấy trong RPMI. Tất cả các môi trường được bổ sung FBS đã bất hoạt bằng nhiệt 10% (Life Technologies), HEPES 1mM (Lonza), glutamin 2mM, penixilin 100 U/ml và Streptomyxin 100µg/ml (Sigma Aldrich).

Để đánh giá sự hình thành khớp thần kinh miễn dịch, các tế bào SVT2 được gây nhiễm bằng retrovirut mã hóa FcRH5 có chiều dài đầy đủ có đuôi gD đầu tận cùng N hoặc virut mã hóa FcRH5 được cắt cụt (tức là, FcRH5 bao gồm cải biến dạng làm khuyết các axit amin 1-744) có đuôi gD đầu tận cùng N. Để đánh giá mức phụ thuộc vào đích khi tiêu diệt FcRH5 TDB, các tế bào FOX-NY được gây nhiễm bằng lentivirut mã hóa FcRH5 có chiều dài đầy đủ. Sau đó, các dòng vô tính có nguồn gốc từ một tế bào đơn lẻ có các mức biểu hiện FcRH5 khác nhau được chọn lọc với puromyxin 2µg/ml.

Để đánh giá tác dụng của việc truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 đối với hoạt tính FcRH5 TDB, các tế bào 293 được gây nhiễm bằng lentivirut mã hóa FcRH5, sau đó

là chuyển nhiễm plasmit mã hóa PD-L1 của người bằng cách sử dụng Lipofectamine (Invitrogen).

D. Thử nghiệm liên kết tế bào phối tử phóng xạ

Kháng thể kháng FcRH5 1G7.v85 được iot hóa bằng cách sử dụng phương pháp Iodogen đến hoạt tính cụ thể là 20μCi/μg. Các hỗn hợp phản ứng cạnh tranh chứa nồng độ cố định của kháng thể đã được iot hóa và các nồng độ giảm của kháng thể không được đánh dấu, được pha loãng theo dãy được đưa vào các đĩa 96 lỗ. Các dòng tế bào biểu hiện FcRH5 nội sinh của người (ví dụ, MOLP-2, Rl-1, KARPAS 620, và KMS21-BM) được rửa bằng dung dịch đệm liên kết, dung dịch này gồm Môi trường Eagle được Dulbecco Cải biến (DMEM) có huyết thanh bào thai bò 2% (FBS), HEPES 50mM (độ pH = 7,2), và natri azit 0,1% và sau đó được bổ sung vào các đĩa 96 lỗ. Các phản ứng cạnh tranh với các tế bào được thử nghiệm lặp lại ba lần giống hệt đối với từng nồng độ của kháng thể không được đánh dấu và được ủ trong hai giờ ở nhiệt độ trong phòng. Sau hai giờ ủ, các hỗn hợp phản ứng cạnh tranh được chuyển sang đĩa lọc Millipore Multiscreen (Billerica, MA) và được rửa bốn lần bằng dung dịch đệm liên kết để tách kháng thể đã iot hóa tự do ra khỏi kháng thể đã iot hóa được liên kết. Các bộ lọc đã được làm khô trong không khí được đếm trên Thiết bị đếm gamma Wallac Wizard 2470 (PerkinElmer Life and Analytical Sciences Inc.; Wellesley, MA) và dữ liệu về khả năng liên kết được đánh giá bằng cách sử dụng phần mềm NewLigand (Genentech), phần mềm này sử dụng thuật toán vẽ theo điểm của Munson và Robard để xác định ái lực liên kết của kháng thể (Munson et al. *Anal. Biochem.* 107:22-39, 1980).

E. Các vật truyền và quá trình chuyển nhiễm nhất thời đối với phương pháp soi kính hiển vi

FcRH5 có đuôi gD đầu tận cùng N được dung hợp vào protein huỳnh quang mRuby2 trước tiên bằng cách chèn FcRH5 vào vật truyền lentivirut pHR-SIN, trước khi thắt trình tự ADN mRuby2 vào vật truyền này, nhờ đó tạo ra pHR-FcRH5-mRuby2. Gen khởi đầu SFFV trong vật truyền này được thay thế sau đó bằng gen khởi đầu mHSP, tạo ra pHRI-FcRH5-mRuby2, mà sử dụng gen khởi đầu yếu hơn pHR, cho phép mức biểu hiện sinh lý của FcRH5-Ruby cao hơn. Các vật truyền biểu

hiện LCK, ZAP70, CSK/CBP, và CD45 đã được mô tả trước đây (James et al. *Nature*. 487:64-69, 2012). Cấu trúc CD45 được sử dụng là dạng đồng đẳng RO hoặc cấu trúc chứa miền bào chất của CD45 có miền xuyên màng và miền ngoại bào của CD43 mà đã biết là có tác dụng mô phỏng chức năng của CD45. Trước khi chuyển nhiễm các cấu trúc, các tế bào HEK được gieo mầm đến mức độ nhập dòng xấp xỉ 60% trong các đĩa 6 lỗ. Sau đó, các vật truyền được chuyển nhiễm một cách nhất thời ở các tỷ lệ thích hợp bằng cách sử dụng GeneJuice (Novagen), tuân theo các hướng dẫn của nhà sản xuất. Các tế bào được sử dụng trong các thử nghiệm từ 24-48 giờ sau khi chuyển nhiễm.

F. Phân tích và chụp hình bằng phương pháp soi kính hiển vi

Để chụp hình các thể tiếp hợp tế bào, $3x10^5$ tế bào của mỗi loại tế bào cần được chụp hình được thu hoạch từ môi trường nuôi cấy và được tái tạo huyền phù trong 100µl TDB 20nM trong RPMI-1640 (không có Phenol-red). Sau 20-30 phút ủ để cho phép tiếp hợp tế bào, các tế bào được rửa bằng PBS, được tái tạo huyền phù trong môi trường chụp hình $DMEM^{gfp2}$ (Evrogen) và được bổ sung vào các đĩa chụp hình 35mm (Mattek). Hệ thống kính hiển vi đồng tiêu đĩa quay của Andor được sử dụng để chụp hình các tế bào ở 37°C. Tất cả các hình ảnh được phân tích và tất cả các hình ảnh đã trình bày được thao tác theo phương thức tương đương bằng cách sử dụng ImageJ. Các hình ảnh đã được trình bày được tách nền và sau đó được cắt bớt để tập trung vào cặp tế bào và độ tương phản được tối ưu hóa. Mức độ tạo cụm và chia tách protein được xác định bằng cách sử dụng cường độ của các protein được đánh dấu huỳnh quang trong màng sinh chất. Màng sinh chất được chọn lọc bằng cách vẽ bằng tay một đường và lấy cường độ huỳnh quang trung bình của màng sinh chất trong phạm vi mặt phân cách tế bào-tế bào chia cho cường độ huỳnh quang trung bình của màng sinh chất bên ngoài mặt phân cách tế bào-tế bào để tính toán mức độ tạo cụm hoặc chia tách. Để tạo ra hình ảnh của mặt phân cách của cặp tế bào được tiếp hợp bằng các TDB từ chồng kiểu z, chồng hình ảnh này trước tiên được giải chập và sau đó được cắt bớt để làm nổi bật vùng mặt phân cách bằng cách sử dụng phần mềm Huygens.

G. Các thử nghiệm hoạt hóa tế bào T và độc tính tế bào *in vitro*

Các tế bào đích được đánh dấu bằng carboxyfloresxein suxinimidyl este (CFSE) theo quy trình của nhà sản xuất (Life Technology, số C34554). Các tế bào đích được đánh dấu bằng CFSE và các tế bào CD8+ đã được tinh chế được trộn theo tỷ lệ giữa tế bào tác động và tế bào đích (E:T) là 3:1 và được ủ với TDB trong 48 giờ. Vào lúc kết thúc quá trình ủ, các tế bào được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy trên FACSCalibur ở dạng thức tự động hóa. Số lượng tế bào đích sống được đếm bằng cách cho vào qua cổng trên các tế bào âm tính với CFSE+/PI. Phần trăm độc tính tế bào được tính toán như sau: độc tính tế bào tính theo % (số lượng tế bào đích sống không có TDB - số lượng tế bào đích sống có TDB)/(số lượng tế bào đích sống không có TDB) X 100.

a. Các dòng tế bào trong thử nghiệm về độc tính tế bào *in vitro*

Quá trình tách các tế bào đơn nhân máu ngoại vi (PBMC) và CD8+, Cell Titer Glo (Promega), và các thử nghiệm về khả năng sống trên cơ sở đếm tế bào theo dòng chảy (48h) được thực hiện như được mô tả trước đây trong tài liệu: Junttila et al. *Cancer Res.* 74:5561-5571, 2014. Tế bào CD8+ được sử dụng làm tế bào tác động theo tỷ lệ tế bào tác động:tế bào đích là 3:1.

b. Các mẫu đa u tủy nguyên phát và các tương bào của người

Dịch chọc tủy xương người từ đối tượng cho khỏe mạnh (ALLCELLS) được pha loãng trong PBS và các tế bào đơn nhân tủy xương (BMMC) được phân lập bằng phương pháp tách gradien thông thường (Lymphoprep, STEMCELL). Thử nghiệm về khả năng sống bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy được sử dụng để kiểm tra tác dụng của phương pháp điều trị FcRH5 TDB 72 giờ đối với các tương bào BMMC. Các BMMC người đã đông lạnh từ các bệnh nhân MM được mua từ Conversant Bio. Các BMMC u tủy được trộn với các tế bào T CD8+ mới được phân lập từ đối tượng cho khỏe mạnh và môi trường đồng nuôi cấy được xử lý bằng FcRH5 TDB trong 72 giờ. Các tế bào CD38+CD138+ âm tính với PI được đếm bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

H. Các thử nghiệm về sự tăng sinh và hoạt hóa tế bào T

Thử nghiệm hoạt hóa tế bào T đã được mô tả trước đây trong tài liệu: Junttila et al. *Cancer Res.* 74:5561-5571, 2014. Các tế bào T CD8+ mới được phân lập được đánh dấu bằng CFSE và được trộn với các tế bào đích (ví dụ, các tế bào MOLP-2) theo tỷ lệ 1:1 và được đồng nuôi cấy bằng TDB 1μg/ml trong 48 giờ hoặc năm ngày. Các tế bào này được nhuộm bằng kháng thể kháng CD8-APC (BD Bioscience, số 555634), kháng thể kháng CD69-PE (BD Bioscience, số 555531), và/hoặc kháng thể kháng CD25-APC (BD Bioscience, số 555434) và dịch pha loãng có cường độ huỳnh quang của CFSE được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

I. Phép phân tích đếm tế bào theo dòng chảy đối với các tương bào của khỉ cyno

Các dịch chọc tủy xương của khỉ cyno được pha loãng (1:10) vào dung dịch đệm phân giải ACK (Life Technology, số Al 0492) hai lần. Tế bào tủy xương của khỉ cyno được nhuộm bằng kháng thể kháng CD45, kháng thể kháng CD20, và kháng thể kháng CD38. Sau khi rửa, các tế bào này được cố định và thấm bằng bộ kit IntraStain (DAKO). Sau đó, các tế bào này được nhuộm bằng kháng thể kháng PC (Dòng vô tính Vs38c). Các tương bào của khỉ cyno được phân loại bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy là CD45-CD20-CD38+PC+.

J. Phép phân tích ELISA về mức IgG của khỉ cyno

Tổng số IgG trong huyết thanh của khỉ cyno được định lượng bằng cách sử dụng ELISA kẹp giữa trên cơ sở so màu tiêu chuẩn. IgG của dê kháng khỉ (Betyl A140-202A) và IgG của dê kháng khỉ đã tiếp hợp với peroxidaza cải ngựa (HRP) (Betyl A140-202P) lần lượt được sử dụng làm kháng thể bắt và kháng thể phát hiện. IgG của khỉ cyno (Cell Sciences CSI20163A) được sử dụng làm tiêu chuẩn định lượng protein.

K. Phép phân tích thấm tách phương Tây

Các tế bào T CD8+ mới được phân lập của người và các tế bào 293T-FcRH5 (tỷ lệ 2:1) được điều trị bằng 1μg/ml của 1G7.v85/38E4.v1 ("1G7.v85 TDB"), 10A8/38E4.v1 ("10A8 TDB"), hoặc kháng thể TDB kháng gD/38E4.v1 ("kháng thể TDB kháng gD") và được rửa trong dung dịch muối được đệm phosphat (PBS) ở 4°C

và được phân giải bằng dung dịch đệm phân giải RIPA (Cell Signaling Technology). pSLP76 (Ser376) và SLP76 được phát hiện ra bằng cách sử dụng các kháng thể và phương pháp thấm tách phương Tây tiêu chuẩn.

Các kết quả

A. Ái lực liên kết của FcRH5 TDB

Giữa các FcRH5 TDB đã được tạo ra là các phân tử bao gồm dòng vô tính 1G7 trong vai trò là miền liên kết FcRH5 và các dòng vô tính đã được chọn trong vai trò là miền liên kết CD3, bao gồm 38E4.v1, 40G5c, và 38.E4.v11. Các kháng thể hu1G7.v1.1 ("1G7.v1.1 TDB"), hu1G7.v1.2 ("1G7.v1.2 TDB"), hu1G7.v1.3 (1G7.v1.3 TDB"), hu1G7.v1.4 ("1G7.v1.4 TDB"), hu1G7.v1.5 ("1G7.v1.5 TDB"), hu1G7.v1.7 ("1G7.v1.7 TDB"), hu1G7.v1.13 ("1G7.v1.13 TDB"), và hu1G7.v1.13.1 ("1G7.v1.13.1 TDB") được tạo ra ở dạng FcRH5 TDB có nhánh kháng CD3 38E4.v1 và được xác định bằng BIACORE®, nhìn chung là như được mô tả trong bản mô tả này, để có ái lực cao đối với mảnh protein FcRH5 tan được (Bảng 13). Các xét nghiệm về mức biểu hiện của 1G7.v85 và 1G7.v87 trong các dạng thức kháng thể một nửa bao gồm cả các thể đột biến "chốt" thu được độ chuẩn cao hơn vạch thảm họa (Fig.8).

Bảng 13. Đánh giá ái lực của tám biến thể đã được làm trưởng thành ái lực được chọn ở dạng thức TDB

Thể loại vùng biến đổi	Kháng thể	K_D
Ban đầu (vùng biến đổi của chuột)	1G7 TDB (giá trị trung bình, n=3)	5,4nM
Phương pháp gây đột biến hướng vị trí của 1G7.v1	1G7.v1.1 TDB	2,7nM
	1G7.v1.2 TDB	2,6nM
	1G7.v1.3 TDB	1,5nM
	1G7.v1.4 TDB	1,4nM
Thư viện kháng thể thể thực khuẩn tập trung (Khuôn mẫu thư viện = 1G7.v1)	1G7.v1.5 TDB	1,1nM
	1G7.v1.7 TDB	0,6nM
	1G7.v1.13 TDB	1,2nM
	1G7.v1.13.1 TDB	0,9nM

B. Khả năng liên kết và tính phản ứng chéo của FcRH5 TDB

Các tế bào SVT2 của chuột nhắt được chuyển nhiễm bằng FcRH5 của người, FcRH5 của khỉ cyno, FcRH1, FcRH2, FcRH3, và FcRH4 của người được sử dụng để kiểm tra khả năng khả năng liên kết và tính phản ứng chéo của FcRH5 TDB. Phương pháp này được thực hiện như sau. Các tế bào SVT2 đã được nuôi cấy được nâng lên bằng cách sử dụng dung dịch đệm phân ly tế bào không enzym (Sigma, số C5914). $1x10^5$ tế bào được tạo huyền phù trong 100µl và được ủ với FcRH5 TDB ở 3µg/ml. Sau đó, các tế bào này được rửa bằng dung dịch đệm FACS (PBS, BSA 1%, EDTA 2mM) và được ủ với Fc PE của dê kháng người (Jackson Immunoresearch, số 109-116-170) ở mức pha loãng 1:100. Các tế bào này được rửa hai lần bằng dung dịch đệm FACS trước khi phép phân tích đếm tế bào theo dòng chảy được thực hiện trên FACSCalibur.

Sau quá trình biến đổi giống như của người và quá trình làm trưởng thành ái lực cho 1G7 của chuột,thì tám biến thể đã được làm trưởng thành ái lực ở dạng thức TDB được tạo ra. Các 1G7 TDB đã được tối ưu hóa được tạo ra ở dạng thức "chốt-vào trong-lỗ" có 38E4.v1 trong vai trò là nhánh kháng CD3. Tất cả tám biến thể này đều thể hiện ái lực được làm tăng gấp từ 5 lần đến 15 lần so với 1G7 TDB của chuột bằng BIACORE® ở dạng thức TDB (Bảng 13). Tất cả các biến thể này đều thể hiện khả năng liên kết âm vào FcRH1 hoặc FcRH4, với các mức liên kết dương khác nhau vào FcRH2 hoặc FcRH3. 1G7.v1.4 TDB đã thể hiện tính phản ứng chéo ít nhất là đối với FcRH2 và FcRH3 (Bảng 14). Khả năng liên kết của FcRH5 TDB chứa các nhánh kháng FcRH5 khác nhau (tức là, 1G7, 1G7.v85, hoặc 1G7.v1.4) vào FcRH3 cũng được đánh giá bằng FACS (Fig.9A).

Bảng 14. Tính phản ứng chéo và khả năng liên kết FcRH5 TDB

TDB	SVT2-FcRH1	SVT2-FcRH2	SVT2-FcRH3	SVT2-FcRH4	SVT2-FcRH5	SVT2-Cyno-FcRH5
1G7	-	-	-	-	+	+
1G7.v1.1	-	+	+	-	++	++
1G7.v1.2	-	+/-	+	-	++	++
1G7.v1.3	-	+	+	-	++	++
1G7.v1.4	-	+/-	+/-	-	++	++
1G7.v1.5	-	+	+	-	++	++
1G7.v1.13	-	+	+	-	++	++
1G7.v1.7	-	+	+	-	++	++
1G7.v1.13.1	-	+/-	+	-	++	++

Các khả năng của 1G7.v1.4, 1G7.v85, và các 1G7 TDB trong việc liên kết huFcRH5 và huFcRH3 được đánh giá bằng phép phân tích BIACORE® (Fig.10A-Fig.10D). Các ái lực của 1G7.v85 TDB và 1G7.v1.4 TDB là tương đương. 1G7.v1.4 TDB đã liên kết vào FcRH5 của người và FcRH3 của người với K_D lần lượt là 2,4nM và ~80nM, và 1G7.v85 TDB đã liên kết vào FcRH5 của người và FcRH3 của người với K_D lần lượt là 2,4nM và ~90nM (Fig.10A-Fig.10D). Các biến thể kháng FcRH5 phụ thêm hu7D8.L1H2, 17B1-VH66, 17B1, và 15G8 (các trình tự được trình bày ở Fig.11A-Fig.13B) cũng được tạo ra ở dạng thức TDB có nhánh kháng CD3 38E4.v1. Các hu7D8.L1H2 TDB, 17B1 TDB, và 15G8 TDB được kiểm tra về khả năng liên kết vào FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno. Các kết quả được trình bày ở Fig.14 và ở Bảng 4.

Việc so sánh khả năng liên kết của 1G7.v85 TDB và 1G7.v93 TDB vào FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno được thực hiện bằng phép phân tích BIACORE® (Fig.15). 1G7.v85 TDB có K_D là 2,1nM về khả năng liên kết vào FcRH5 của người và K_D là 7,8nM về khả năng liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno. 1G7.v93 TDB có K_D là 1,1nM đối với FcRH5 của người và 8,1nM đối với FcRH5 của khỉ cyno.

Các thử nghiệm xác định đặc điểm động học được thực hiện (xem Bảng 8). Trong các thử nghiệm này, khả năng liên kết của mảnh protein FcRH5 tan được vào các kháng thể được tinh chế ở dạng thức kháng thể TDB của người được phân tích ở sáu mức nồng độ khác không khác nhau (dãy pha loãng nối tiếp theo tỷ lệ 1:3, một nồng độ được tiêm hai lần ở dạng lặp lại giống hệt). Tốc độ dòng chảy được ấn định ở mức 40µl/phút và hiện tượng kết hợp và hiện tượng phân ly được theo dõi trong 600 giây. Phép phân tích động học của ái lực 1G7.v85 TDB có hóa trị một bằng cách sử dụng dạng thức bắt hIgG và mô hình liên kết 1:1 đã tạo ra K_D đối với FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno lần lượt là 2,4nM và 6,8nM (Fig.16A-Fig.16B). Việc gây đột biến Met-64_{HC} dễ bị oxy hóa thành Val trong 1G7.v85 TDB không ảnh hưởng gì đến ái lực liên kết.

C. Các thử nghiệm về độc tính tế bào *in vitro*

Để đánh giá chức năng của các biến thể FcRH5 TDB đã biến đổi giống như của người, độc tính tế bào đối với các tế bào FcRH5 MOLP-2 biểu hiện FcRH5 theo kiểu nội sinh được kiểm tra. Tất cả các biến thể đều thể hiện hoạt tính tiêu diệt tế bào đích tương tự nhau nhưng tăng hoạt tính một cách đáng kể so với 1G7 của chuột (Fig.17A-Fig.17B). Trong trường hợp biến thể 1G7.v1.4 TDB, EC50 đã cải thiện gấp từ 5 lần đến 13 lần so với 1G7 TDB của chuột (n=10).

Dựa trên hoạt tính gây độc tế bào cao và tính phản ứng chéo thấp của nó đối với các thành viên họ khác, 1G7.v1.4 TDB được chọn lọc để phân tích thêm. Để làm tăng tính ổn định của phân tử TDB, nhánh 1G7.v1.4 được gây đột biến ở các vị trí oxy hóa tiềm tàng, nhờ đó tạo ra phiên bản hoàn thiện, 1G7.v85. Hai phiên bản, 1G7.v1.4 và 1G7.v85, được đánh giá ở dạng thức TDB trong các thử nghiệm khác nhau, bao gồm khả năng hoạt hóa tế bào T, hoạt tính tiêu diệt tế bào MOLP-2 đích, khả năng làm tiêu tan tế bào B của khỉ cyno *in vitro*, và khả năng làm tiêu tan tương bào của khỉ cyno (Fig.18A-Fig.18D). Trong tất cả các thử nghiệm được kiểm tra, 1G7.v85 TDB đều biểu hiện một cách không thể phân biệt được với 1G7.v1.4 TDB.

1G7.v87 TDB được biến đổi giống như của người và hoàn thiện cũng được đem so sánh với 1G7.v85 TDB. Nhất quán với ái lực thấp hơn của nó, 1G7.v87 TDB

biểu hiện khả năng liên kết vào FcRH5 của người giảm đi so với 1G7.v85 TDB như được chỉ báo bằng phép phân tích đếm tế bào theo dòng chảy (Fig.19A). 1G7.v87 cũng thể hiện tính phản ứng chéo âm tính đối với FcRH3.

Độc tính tế bào đối với tế bào đích của 1G7.v87 TDB và 1G7.v85 TDB được đánh giá đối với tế bào MOLP-2 CD8+ (Fig.19B) và đối với PBMC từ bốn đối tượng cho khỏe mạnh (Fig.19C). Trong tất cả các đối tượng cho, 1G7.v87 TDB âm tính đối với khả năng tiêu diệt tế bào B của người, trong khi 1G7.v85 TDB thể hiện mức độ hoạt tính tiêu diệt dương tính nhất định. PBMC của khỉ cyno từ bốn đối tượng cho khỏe mạnh cũng được kiểm tra (Fig.19D). Mức xếp hạng các EC50 của ba phiên bản 1G7 TDB là nhất quán ở tất cả ba đối tượng cho. 1G7.v87 TDB tương đương với 1G7 TDB của chuột nhưng có hoạt tính ít hơn một cách đáng kể so với 1G7.v85 TDB. 1G7.v87 TDB đã thể hiện hoạt tính tiêu diệt yếu hơn một cách đáng kể so với 1G7.v85 TDB đối với các tế bào B của khỉ cyno *in vitro*. 1G7.v85 TDB cũng được đánh giá về hoạt tính đối với các tế bào NK của người và được phát hiện ra là không có hoạt tính tiêu diệt $\leq 20\mu g/ml$ (Fig.9B). EC50 của 1G7.v85 TDB thì tốt hơn gấp từ 5 lần đến 8 lần so với EC50 của 1G7.v87 TDB.

D. Đánh giá phân tử về tính ổn định của FcRH5 TDB

Tính ổn định hóa học của hu1G7.v1 trước khi làm trưởng thành ái lực đã thể hiện tính nhạy oxy hóa ở Met-64_{HC} và Trp-52_{HC}. Các mẫu 1G7.v85 TDB được tạo ứng suất thông qua xét nghiệm AAPH và xét nghiệm ứng suất ánh sáng và được đánh giá về khả năng liên kết FcRH5 bằng BIACORE®. 1G7.v85 TDB đã thể hiện khả năng liên kết giảm đối với FcRH5 sau cả xét nghiệm AAPH và xét nghiệm ứng suất ánh sáng khi so với đối chứng không được tạo ứng suất (Fig.20A-Fig.20D). Tính ổn định của monome và tính không thuần nhất điện tích của 1G7.v85 TDB lần lượt được đánh giá bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) và điện di hội tụ đẳng điện mao quản chụp hình (icIEF), sau khi được tạo ứng suất trong dung dịch đệm có độ pH thấp (his-axetat, độ pH = 5,5) trong 2 tuần (Fig.21A-Fig.21B). Sự thay đổi quan sát được về mức hao hụt đỉnh monome là nhỏ đối với cả tính ổn định của monome (0,1%) và tính không thuần nhất điện tích (7,7%) (Fig.21A-Fig.21B). Ngoài ra, không có thay đổi có thể quan sát được nào về khối lượng của

chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng của 1G7.v85 TDB sau hai tuần ở ứng suất độ pH thấp (Fig.22A-Fig.22B). Sau ứng suất nhiệt ở 30°C trong 2 tuần, mức hao hụt đỉnh monome là 0,1% theo SEC và 8% theo icIEF.

E. Epitop gần màng là cần thiết cho quá trình truyền tín hiệu TCR hiệu quả và hoạt tính tiêu diệt hiệu quả của FcRH5 TDB

Để đặc trưng hóa các sự kiện phân tử mà dẫn đến việc khởi phát thụ thể tế bào T (T cell receptor-TCR) khi kích thích bằng FcRH5 TDB, một hệ thống đã tái lập được sử dụng (James et. al. *Nature.* 487:64-69, 2012) mà cho phép có các sự kiện ban đầu dẫn đến sự hoạt hóa thụ thể đang cần nghiên cứu theo phương thức có kiểm soát. Bằng cách sử dụng các tế bào CD8 từ đối tượng cho khỏe mạnh, 1G7/UCHT1.v9 TDB đã đem lại sự phosphoryl hóa SLP76 rất mạnh, là chỉ báo cho sự truyền tín hiệu TCR, và điều tiết quá trình tiêu diệt hiệu quả các tế bào đích (Fig.23A-Fig.23B; EC50 = 0,5nM). Ngược lại, kháng thể TDB kháng gD, kháng thể này hướng đích đến epitop xa màng, không tạo ra sự truyền tín hiệu TCR có thể phát hiện được và không thể điều tiết quá trình tiêu diệt tế bào T (Fig.23A-Fig.23B). Cũng đã xác nhận được rằng hoạt tính TDB được quyết định bởi vị trí của epitop và kích cỡ của miền ngoại bào bằng cách hướng đích đến các tế bào biểu hiện đích đã bị cắt cụt nhiều mà giữ lại epitop 1G7 và epitop gD (Fig.23C). Hoạt tính của 1G7/UCHT1.v9 TDB gần tăng lên gấp 25 lần (Fig.23D; EC50 = 20pM), và gD TDB và có thể điều tiết một cách hữu hiệu quá trình tiêu diệt các tế bào (EC50 = 0,19nM) khi loại bỏ được sự cản trở do ECD gây ra. Xác suất mà mức biểu hiện đích chênh lệch là nguyên nhân gây chênh lệch hoạt tính giữa các dòng tế bào được loại trừ bằng phép phân tích FACS (Fig.24A).

Để chứng minh rằng các mức chênh lệch về hoạt tính tiêu diệt này liên quan đến epitop chứ không phải các thuộc tính của các dòng vô tính kháng thể đặc hiệu, thì tổng cộng năm dòng vô tính kháng thể độc nhất hướng đích đến miền gần màng của FcRH5 ở dạng thức TDB được kiểm tra và đã cho thấy rằng hoạt tính của mỗi dòng vô tính này cao hơn ~20 lần so với 10A8 (Fig.23E). Mức biểu hiện nội sinh của FcRH5 ở dòng đa u tủy là thấp (ví dụ, ~100 đến ~2000 bản sao/tế bào) và tương đương với dòng tế bào u tủy MOLP-2 (ví dụ, ~2200 bản sao/tế bào). Khi các tế bào

T được tái hướng đích để tiêu diệt các tế bào MOLP-2, thì chỉ có các TDB gần màng là kích thích việc tiêu diệt các tế bào MOLP-2. Việc hướng đích đến vùng giữa của FcRH5 bằng cách sử dụng 10A8 TDB không đem lại sự khởi phát TCR đủ cao cần để tiêu diệt các tế bào u tủy (Fig.24B).

F. FcRH5 TDB kích thích việc tiêu diệt tế bào phụ thuộc vào đích và hiện tượng tăng sinh tế bào T

Ở Fig.18A, 1G7.v1.4 TDB và 1G7.v85 TDB được phát hiện ra là có khả năng hoạt hóa tế bào T không thể phân biệt được. 1G7.v85 TDB được đánh giá về tính đặc hiệu epitop 1G7 và tính phản ứng chéo của khỉ cyno (Fig.25A-Fig.25C). 1G7/38E4.v1 TDB ("1G7 TDB") liên kết vào các tế bào MOLP-2, các tế bào B của đối tượng cho khỏe mạnh, các tương bào tủy xương, và các tế bào khối u u tủy nguyên phát như được dự kiến (Fig.26A-Fig.26D). Phép phân tích tiền lâm sàng về hoạt tính 1G7 TDB được bắt đầu bằng quá trình xác định đặc điểm cơ chế tác động bằng cách sử dụng các tế bào CD8 từ đối tượng cho khỏe mạnh. Quá trình xử lý 1G7 TDB các tế bào biểu hiện đích tạo ra sự hoạt hóa tế bào T phụ thuộc vào liều lượng (Fig.27A). Hoạt tính gây độc tế bào của 1G7 TDB mang tính loại trừ đối với các tế bào dương tính đích và tương quan với mức biểu hiện FcRH5 (Fig.27B). Quá trình hoạt hóa tế bào T thông qua kích thích bằng 1G7 TDB và tế bào đích dẫn đến hiện tượng tăng sinh mạnh mẽ của các tế bào T. Trong năm ngày, 95% tế bào CD8 đã trải qua sáu lần phân chia tế bào như được thể hiện thông qua pha loãng thuốc nhuộm huỳnh quang CSFE (Fig.27C-Fig.27E). Sự đóng góp của nhánh kháng CD3 và miền Fc vào hoạt tính gây độc tế bào của TDB được đánh giá thêm, và đã phát hiện ra rằng nhánh kháng CD3 ái lực cao là cần thiết, còn miền Fc thì không cần thiết, để đạt được hoạt tính gây độc tế bào (Fig.27F-Fig.27G).

G. FcRH5 TDB điều tiết việc tiêu diệt hiệu quả các tương bào bình thường và các tế bào u tủy nguyên phát được lấy từ bệnh nhân

Quá trình biểu hiện của FcRH5 trong các tế bào đa u tủy CD138+CD38+ và các tương bào tủy xương bình thường được nghiên cứu bằng cách sử dụng 1G7.v85 TDB và FACS. Tất cả các tế bào khối u được lấy từ bệnh nhân và tất cả các tương bào bình thường biểu hiện FcRH5 trong tất cả các mẫu đều cho thấy mức phổ biến

100% đối với u tủy (Fig.28A). Độ biến thiên đáng kể giữa các bệnh nhân về mức biểu hiện được phát hiện thấy trong u tủy. Nhìn chung, mức biểu hiện trong các tế bào khối u không tăng lên một cách đáng kể so với các tương bào bình thường, điều này cho thấy rằng việc phát triển FcRH5 TDB dự trữ tương bào bình thường, đặc hiệu với tế bào khối u có thể là không khả thi. Mức biểu hiện trong các tế bào B bình thường thấp hơn một cách đáng kể và nhất quán so với các tương bào bình thường và các tế bào khối u đa u tủy.

Gen FcRH5 nằm ở điểm đứt nhiễm sắc thể trong 1q21 (Hatzivassiliou et al. *Immunity.* 14:277-289, 2001). Phân tích ~20 mẫu sinh thiết đa u tủy nguyên phát đã cho thấy mối liên quan đáng kể giữa sự biểu hiện ARN của FcRH5 và sự tăng 1q21 (Fig.28E), cho thấy rằng sự chuyển vị nhiễm sắc thể có thể dẫn đến hiện tượng biểu hiện quá mức FcRH5 ở các bệnh nhân u tủy nguy cơ cao.

Khả năng của 1G7.v85 TDB trong việc tiêu diệt các tương bào được phân tích bằng cách hướng đích đến các tế bào đơn nhân tủy xương (BMMC) đã được phân lập từ các dịch chọc tủy xương của đối tượng cho khỏe mạnh (Fig.28B). 1G7.v85 TDB kích thích việc tiêu diệt các tương bào hữu hiệu ở mức cao, công hiệu và phụ thuộc vào liều lượng (EC50 = 85-180pM). Hoạt tính mạnh tương tự được phát hiện ra khi BMMC từ các bệnh nhân đa u tủy được cho điều trị bằng 1G7.v85 TDB (Fig.28C). Mức tiêu diệt các tế bào u tủy gần 100% được phát hiện ra cùng với độ công hiệu cao (EC50 = 60-1200pM) bất kể tiền sử điều trị trong đời.

Khi mà mức biểu hiện FcRH5 biến đổi ở bệnh u tủy (Fig.28A) và hoạt tính 1G7.v85 TDB tương quan với mức biểu hiện đó (Fig.28D), thì việc liệu bệnh nhân có phổ biểu hiện ở giới hạn dưới có được dự đoán là đáp ứng với FcRH5 TDB hay không cũng được nghiên cứu. Dòng tế bào u tủy MOLP-2 được nhận diện ở dạng dòng tế bào chuẩn mực mà có mức biểu hiện FcRH5 tương tự với mức biểu hiện trung bình ở các tương bào và các tế bào MM nguyên phát (Fig.28A). Các tác giả sáng chế cũng đã nhận diện được một vài dòng tế bào ung thư mà biểu hiện đích ở mức cực kỳ thấp và xác định số lượng FcRH5 trong mỗi tế bào bằng cách sử dụng phép phân tích Scatchard. Khoảng vị trí liên kết FcRH5 ở các dòng tế bào này thay đổi từ 2200 đến mức thấp bằng 160 trong mỗi tế bào. Mặc cho số lượng bản sao đích

rất thấp, 1G7.v85 TDB vẫn kích thích việc tiêu diệt mạnh tất cả các dòng tế bào được kiểm tra (EC50 = 2-230pM). Các phép tính về mức chiếm giữ đã cho thấy rằng ít đến mức là ~50 phân tử TDB (mức chiếm giữ 2% ở MOLP-2; EC50 = 58 pM) là đủ để kích thích quá trình hoạt hóa tế bào T và hiện tượng chết tế bào theo chương trình của tế bào đích.

Nói tóm lại, FcRH5 được biểu hiện ở tất cả các bệnh nhân u tủy. FcRH5 TDB có thể tiêu diệt các tương bào của người và các tế bào khối u u tủy nguyên phát được lấy từ bệnh nhân ở liều lượng pM. Khi mà cần rất ít TDB để chuyển hướng hoạt tính tế bào T, thì phân tử này tiêu diệt một cách công hiệu các tế bào có mức biểu hiện đích rất thấp. Các kết quả này cho thấy rằng FcRH5 TDB có tiềm năng là có hoạt tính rộng ở các bệnh nhân u tủy và không hỗ trợ việc loại trừ các bệnh nhân khỏi liệu pháp dựa trên mức biểu hiện FcRH5.

H. Khỉ đuôi dài (cyno) là mô hình về độ hiệu nghiệm và độ an toàn thích hợp dùng cho FcRH5 TDB

Phép phân tích FACS của các tế bào B ngoại vi và các tương bào tủy xương đã xác nhận rằng FcRH5 được biểu hiện trong toàn bộ dòng tế bào B ở khỉ cyno tương tự như người (Fig.29A-29B; Polson et al. *Int. Immunol.* 18:1363-1373, 2006). Các trình tự axit amin của FcRH5 của người và FcRH5 của khỉ cyno đồng nhất 89%, và 1G7.v85 TDB liên kết vào FcRH5 của khỉ cyno và CD3 với ái lực tương đương. Quá trình điều trị *in vitro* cho các tế bào đích biểu hiện FcRH5 của khỉ cyno hoặc các tế bào MOLP-2 biểu hiện FcRH5 của người đã đem lại khả năng tiêu diệt mạnh bằng cách sử dụng các tế bào T ngoại vi từ người hoặc khỉ cyno có hiệu quả tương đương (Fig.29C-Fig.29D). Việc bổ sung 1G7.v85 TDB vào các mẫu PBMC/BMMC từ khỉ cyno đã đem lại khả năng tiêu diệt mạnh và phụ thuộc vào liều lượng đối với các tế bào B của khỉ cyno (Fig.29E) và các tương bào tủy xương (Fig.29F). Ở Fig.18C, 1G7.v1.4 TDB và 1G7.v85 TDB được phát hiện ra là có khả năng tiêu diệt tương bào của khỉ cyno không thể phân biệt được. Các kết quả này xác nhận cyno là một mô hình về độ hiệu nghiệm và độ an toàn thích hợp dùng cho kháng thể kháng FcRH5/CD3.

Ví dụ 4. Xác định đặc điểm *in vivo* FcRH5 TDB làm ví dụ

Vật liệu và phương pháp

A. Các nghiên cứu về độ hiệu nghiệm *in vivo* ở các mô hình chuột

a. Mô hình dị ghép chuột nhắt huNSG/MOLP-2

Các con chuột nhắt cái NOD.Cg-Prkdcscid Il2rgtm1Wjl/SzJ (NOD/scid gamma; NSG) đã được biến đổi giống như của người thu được từ Jackson Laboratory. Vào ngày tiêm chủng tế bào, năm con vật được chủng ngừa bằng 0,2ml tế bào khối u MOLP-2 ở nồng độ là 100 triệu tế bào/ml, trong HBSS/matrigel, theo kiểu dưới da vào cạnh sườn phải. Ngay khi các thể tích khối u đạt đến khoảng thể tích là 100-250mm^3, các con chuột này được chọn ngẫu nhiên vào hai nhóm, nhóm chất dẫn thuốc và nhóm điều trị, và cho dùng các phương pháp điều trị đầu tiên vào thời điểm đó (Ngày 0). Tất cả các phương pháp điều trị được cho dùng mỗi tuần một lần bằng phương thức tiêm trong tĩnh mạch (i.v.) ở tĩnh mạch đuôi với tổng cộng bốn liều. Nhóm chất dẫn được điều trị bằng 0,1ml histidin axetat 20mM, độ pH = 5,5, sucroza 240mM, dung dịch đệm TW-20 0,02%. Nhóm điều trị được điều trị bằng 0,1ml 1G7.v85 TDB ở nồng độ là 0,5mg/kg. Các khối u được đo 1-2 lần mỗi tuần bằng thước kẹp trong suốt quá trình nghiên cứu, và thể trọng của các con chuột đó được đo ít nhất mỗi tuần một lần. Trong suốt quá trình nghiên cứu này, các quan sát lâm sàng được thực hiện hai lần mỗi tuần để theo dõi sức khỏe của các con chuột.

B. Nghiên cứu độc học ở khỉ đuôi dài

Khả năng dung nạp, biên dạng độc tính, dược động học (PK), và dược lực học (PD) của kháng thể kháng FcRH5 TDB được đánh giá ở khỉ đuôi dài (cyno) đực chưa qua thí nghiệm ở Charles River Laboratories (CRL). Các con khỉ cyno được điều trị bằng một liều đơn, truyền trong tĩnh mạch (1h) chất dẫn thuốc, 1, 2, hoặc 4mg/kg 1G7.v85 TDB và được mổ khám nghiệm xác bảy ngày sau khi điều trị. Các con vật này được theo dõi một cách chặt chẽ về các quan sát lâm sàng chi tiết, nhịp hô hấp, và thân nhiệt trong suốt năm giờ đầu tiên và vào thời điểm kết thúc. Các quan sát lâm sàng tại lồng và thể trọng được thu thập hằng ngày. Các mẫu máu được thu gom bằng phương pháp chích tĩnh mạch qua tĩnh mạch đùi trước khi nghiên cứu và ở các thời

điểm được chọn xuyên suốt nghiên cứu này để dùng cho các phân tích về huyết học, hóa học huyết thanh, sự đông tụ, và tổng mức kháng thể theo PK) và các điểm cuối PD. PD gồm các số liệu đo của xytokin (IL-1β, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-12/23, IL-13, IL-17, G-CSF, GM-CSF, IFN-γ,TNF-α, và MCP-1), phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy đối với bạch huyết bào T, bạch huyết bào B, các tế bào NK, bạch huyết bào T được hoạt hóa, PD-1, và IgG tuần hoàn của khỉ cyno. Tủy xương được thu gom ở các con vật đã được gây tê bằng phương pháp chọc hút từ xương chân trước trước khi nghiên cứu và trước khi mổ khám nghiệm xác vào Ngày 8 để dùng cho quá trình đánh giá bạch huyết bào B và các tương bào bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Vào thời điểm mổ khám nghiệm xác, trọng lượng của cơ quan được đo và các mô và cơ quan đã chọn được kiểm tra một cách kỹ lưỡng bằng phương pháp kiểm tra đại thể và phương pháp kiểm tra vi thể. Các hạch bạch huyết lá lách, màng treo ruột, và hạch bạch huyết hàm dưới được đánh giá về bạch huyết bào T, bạch huyết bào B, và các tế bào NK. Tất cả các quy trình này đều được thực hiện tuân theo Đạo luật về Phúc lợi cho Động vật, Chỉ dẫn về Chăm sóc và Sử dụng Động vật Phòng Thí nghiệm, và Cơ quan phúc lợi cho Động vật Phòng Thí nghiệm.

C. Nghiên cứu PKPD ở khỉ đuôi dài và chuột nhắt

Các nồng độ của FcRH5 TDB trong huyết thanh được xác định bằng ELISA di truyền. Kháng thể IgG của cừu kháng người được sử dụng làm chất phản ứng bắt, và IgG của cừu kháng người đã tiếp hợp vào peroxidaza cải ngựa (HRP) được sử dụng làm chất phản ứng phát hiện. Phép phân tích về nồng độ trong huyết thanh theo thời gian từ các mẫu sẵn có được phân tích bằng mô hình không ngăn có đầu vào liều bolus IV (Phoenix™ WinNonlin®, Phiên bản 6.3; Pharsight Corporation; Mountain View, CA). Thời gian thu gom mẫu danh nghĩa và các mức nồng độ liều lượng danh nghĩa được sử dụng trong phép phân tích dữ liệu. Tất cả phép phân tích TK đều dựa trên dữ liệu về động vật riêng biệt.

Các kết quả

A. FcRH5 TDB ức chế sự tăng trưởng của các khối u MOLP-2 đã được thiết lập ở các con chuột nhắt được tái lập với các tế bào miễn dịch của người

Việc lập mô hình hoạt tính kháng u tủy của FcRH5 TDB ở chuột nhắt đang gặp thách thức vì các kháng thể kháng CD3 không phản ứng chéo với CD3 của chuột nhắt và gen trực giao FcRH5 không tồn tại ở chuột nhắt. Do đó, mô hình chuột nhắt có hệ miễn dịch của người đã tái lập được thiết lập bằng cách cấy ghép các tế bào gốc tạo huyết của người chọn lọc CD34+ vào các con chuột nhắt được chiếu xạ (chuột nhắt huNSG). Các tế bào CD8+ của người thu được từ lá lách của các con chuột nhắt huNSG có thể tiêu diệt tế bào MOLP2 *in vitro* với hiệu quả tương đương với các tế bào CD8+ ngoại vi của người từ đối tượng cho khỏe mạnh (Fig.30A). 20 tuần sau cấy ghép, các con chuột huNSG này được chủng ngừa bằng năm triệu tế bào MOLP-2 theo kiểu dưới da. Các con có khối u 100-200 mm^3 đã được thiết lập được điều trị bằng liều IV đơn lẻ của chất dẫn thuốc hoặc 0,5mg/kg FcRH5 TDB. Phương pháp điều trị bằng FcRH5 TDB đã đem lại sự thoái triển khối u ở tất cả các con chuột nhắt (Fig 30B), chỉ ra rằng phương pháp điều trị bằng FcRH5 TDB ức chế sự tăng trưởng của khối u *in vivo*.

B. FcRH5 TDB có thời gian bán hủy trong huyết thanh dài

Nghiên cứu liều đơn được thiết kế để đánh giá về độ an toàn, độ hiệu nghiệm, các thuộc tính dược động học (PK), và dược lực học (PD) của 1G7.v85 TDB ở các động vật linh trưởng không phải người. Các con khỉ cyno được điều trị bằng một liều truyền trong tĩnh mạch chậm của chất dẫn thuốc hoặc 1-4mg/kg 1G7.v85 TDB. Các con vật này được theo dõi một cách chặt chẽ về các tác động có hại. Các mẫu máu được thu gom vào thời điểm 0, 2, 6, và 24h để dùng cho phân tích xytokin, phân tích bệnh học lâm sàng, và đáp ứng PK/PD. Chấm dứt nghiên cứu này vào bảy ngày sau khi cho dùng phương pháp điều trị. FcRH5 TDB đã thể hiện mức phơi nhiễm tỷ lệ với liều lượng (Cmax và AUC) từ 1-4mg/kg và được thanh thải 29-33ml/ngày/kg ở tất cả các đoàn hệ (Fig.31A) và Cmax ở mức liều lượng 4mg/kg là 129µg/ml. Mức này cao hơn gấp ~2000 lần mức cần thiết để đạt được EC50 tiêu diệt *in vitro* đối với các tương bào của người và MOLP-2. Nghiên cứu PK cũng được thực hiện ở các con chuột nhắt SCID.bg, mà không có tính ràng buộc, và 1G7.v85 TDB được phát hiện ra là có tốc độ thanh thải tương đương với kháng thể TDB kháng gD (Fig.31B). Các phép tính về mức chiếm giữ thụ thể đã cho thấy sự kết hợp FcRH5 gần bão hòa trên

các tế bào B máu ngoại vi ở Cmax ở tất cả các mức liều lượng (Fig.32D). Các kết quả này đã cho thấy rằng 1G7.v85 TDB có thời gian bán hủy *in vivo* dài và hỗ trợ lịch biểu dùng thuốc hằng tuần hoặc ít thường xuyên hơn.

C. FcRH5 TDB làm tiêu tan các tế bào B và các tương bào tủy xương ở khỉ cyno

Phép phân tích FACS của máu ngoại vi đã cho thấy tác dụng dược lý mạnh đối với tất cả các mức liều lượng. Việc điều trị 1G7.v85 TDB dẫn đến sự hoạt hóa tế bào T và giảm bạch huyết bào nhất thời (đáp ứng bám vào rìa) trong vòng 24 giờ (Fig.31C-Fig.31D). Các tế bào B vẫn không thể phát hiện được trong máu bảy ngày sau liều dùng, cho thấy rằng chúng được làm tiêu tan bởi 1G7.v85 TDB (Fig.31E). Ngược lại, tế bào CD4+ và tế bào CD8+ được thu hồi trước thời điểm kết thúc nghiên cứu (Fig.32A-Fig.32B). Tất cả các mức liều lượng này đều dẫn đến việc làm tiêu tan hoàn toàn các tế bào B ở lá lách và tủy xương (Fig.31F và Fig.31H). Phương pháp điều trị bằng FcRH5 đã kích thích sự tiêu tan phụ thuộc vào liều lượng mạnh đối với các tế bào B cũng từ hạch bạch huyết (Fig.31G và Fig.32C).

Sự tiêu tan các tương bào tủy xương của khỉ cyno *in vivo* là điểm cuối hiệu nghiệm cốt yếu trong quá trình phát triển tiền lâm sàng của kháng thể kháng FcRH5/CD3. Hiện tượng tiêu tan hoàn toàn các tương bào được phát hiện thấy ở các con được điều trị bằng liều lượng 2-4mg/kg (Fig.31I). Quá trình điều trị 1G7.v85 TDB cũng đã đem lại sự giảm phụ thuộc vào liều lượng của IgG khỉ cyno, một kết quả thứ yếu được dự kiến nhờ sự tiêu tan tương bào. Về mặt lý thuyết, hiện tượng tiêu tan hoàn toàn các tương bào sẽ làm giảm mức IgG ~ 30-40% trước Ngày 7. Mức giảm đo được của IgG khỉ cyno là 37% ở nhóm 2mg/kg và 44% ở nhóm 4mg/kg (Fig.31J). Nói tóm lại, các 1G7.v85 TDB đã kích thích đáp ứng PD mạnh ở khỉ cyno, nhất quán với cơ chế tác động của nó. Sự tiêu tan tương bào hoàn toàn đem lại bằng chứng thuyết phục về độ hiệu nghiệm trong vi môi trường tủy xương.

D. FcRH5 TDB được dung nạp tốt ở khỉ cyno

1G7.v85 TDB được dung nạp tốt ở khỉ cyno ở các mức liều lượng ≤ 4mg/kg. Các tác động có hại nhẹ/vừa phải mà được phát hiện ra là tương tự ở tất cả các mức liều lượng và các tác giả sáng chế đã không thấy được một đáp ứng liều lượng rõ ràng nào. Các quan sát lâm sàng bị giới hạn ở sự gia tăng thuận nghịch về thân nhiệt nằm

trong khoảng từ 0,4 đến 1,6°C trong vòng bốn giờ sau liều dùng. Các tác dụng đối với huyết học gồm giảm bạch huyết bào thuận nghịch và giảm bạch huyết bào cấp tính theo dự kiến được quy cho là do hiện tượng bám vào rìa. Như được dự kiến, bằng chứng về tình trạng viêm phục hồi được và cấp tính được phát hiện ra (tăng CRP, fibrinogen, thời gian prothrombin, và thời gian thromboplastin một phần được hoạt hóa). Việc điều trị này đã gây ra sự gia tăng thuận nghịch ở ALT, AST, và tổng số bilirubin.

Nhất quán với cơ chế tác động, 1G7.v85 TDB kích thích việc giải phóng xytokin nhanh, thường là nhẹ/vừa phải (Fig.33A-Fig.33F). Tất cả các mức liều lượng đều kích thích đáp ứng tiền viêm (bao gồm cả IL-6, IL-5, IFN-g, IL-2, IL-13, G-CSF và MCP-1) và đáp ứng chống viêm để chống lại sự đạt đỉnh (IL1R) này ở thời điểm 2-6 giờ. Tất cả các xytokin được đảo ngược trở lại mức bình thường trong vòng 24 giờ. Không thấy có dấu hiệu nào về sự giải phóng xytokin rộng rãi hoặc kéo dài. Phép phân tích mô bệnh học bao quát bao gồm phép phân tích chi tiết về hệ thần kinh trung ương (CNS) không biểu lộ độc tính cơ quan đáng kể. Nói tóm lại, không đạt được liều lượng dung nạp tối đa trong nghiên cứu này. 1G7.v85 TDB được dung nạp tốt ở các mức liều lượng mà được kỳ vọng là làm bão hòa đích và đủ để làm tiêu tan hoàn toàn các tế bào B và các tương bào. Không phát hiện được đáp ứng liều lượng nào về các tác động có hại.

Ví dụ 5. Các liệu pháp kết hợp FcRH5

Để kiểm tra các liệu pháp kết hợp FcRH5 có thể có, FcRH5 TDB được kiểm tra ở dạng kết hợp với mỗi một trong số hai chất đối kháng liên kết trục PD-1 làm ví dụ. Các thử nghiệm này đã cho thấy rằng, mặc dù việc truyền tín hiệu phản hồi của PD-1/PD-L1 có thể làm giảm khả năng tiêu diệt qua trung gian FcRH5 TDB, sự phong bế PD-L1 đã khắc phục được tình trạng ức chế này, đem lại độ hiệu nghiệm trị liệu cải thiện.

Vật liệu và phương pháp

A. Các kháng thể

Tất cả các kháng thể được đánh dấu dùng cho phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy, ngoại trừ các kháng thể được đề cập khác đi, được mua từ BD Bioscience. Kháng thể kháng PD-1 được sử dụng là KEYTRUDA® (pembrolizumab) và kháng thể kháng PD-L1 được tạo ra ở Genentech, Inc. IgG của dê kháng người và IgG của dê kháng chuột nhắt được mua từ Jackson Immunoresearch. Kháng thể kháng PC-FITC (dòng vô tính Vs38c) được mua từ DAKO.

B. Thử nghiệm kích thích PD-1 và thử nghiệm về độc tính tế bào với kháng thể kháng PD-L1

Các tế bào T CD8+ của người mới được phân lập được trộn với các tế bào MOLP-2 theo tỷ lệ 1:1 và được đồng nuôi cấy khi có mặt 1000 ng/ml 1G7.v85 TDB trong 48 giờ. Các tế bào này được nhuộm bằng kháng thể kháng CD8 đã được đánh dấu bằng floresxein isothioxyanat (FITC) ("kháng thể kháng CD8-FITC"), kháng thể kháng CD69 đã được tiếp hợp với phycoerythrin (PE) ("kháng thể kháng CD69-PE"), và kháng thể kháng PD-1 đã được tiếp hợp với alophycoxyanin (allophycocyanin-APC) ("kháng thể kháng PD-1-APC"), và được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy. Thử nghiệm về độc tính tế bào đối với các tế bào HEK-293T biểu hiện FcRH5 và PD-L1 ("các tế bào 293-FcRH5-PD-L1") được thiết lập, như được mô tả một cách khái quát trong bản mô tả này, có hoặc không có 10mg/ml kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng thể kháng PD-1 và được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy.

C. Nuôi cấy tế bào và tạo dòng tế bào ổn định

Tác dụng của việc truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 đối với hoạt tính 1G7.v85 TDB được đánh giá bằng cách gây nhiễm các tế bào HEK-293T bằng lentivirut mã hóa FcRH5, sau đó chuyển nhiễm plasmit mã hóa PD-L1 của người bằng cách sử dụng lipofectamin (Invitrogen).

D. Các thử nghiệm hoạt hóa tế bào T và độc tính tế bào *in vitro*

Các tế bào đích được đánh dấu bằng carboxyfloresxein suxinimidyl este (CFSE) theo quy trình của nhà sản xuất (Life Technology, số C34554). Các tế bào đích được đánh dấu bằng CFSE này và các tế bào CD8+ đã được tinh chế được trộn theo tỷ lệ giữa tế bào tác động và tế bào đích (E:T) là 3:1 và được ủ với 1G7.v85 TDB trong khoảng thời gian từ 24 đến 48 giờ. Vào lúc kết thúc quá trình ủ, các tế bào này được phân tích bằng phương pháp đếm tế bào theo dòng chảy trên FACSCalibur ở dạng thức tự động hóa. Số lượng tế bào đích sống được đếm bằng cách cho vào qua cổng trên các tế bào âm tính với CFSE+/PI. Phần trăm độc tính tế bào được tính toán như sau: độc tính tế bào tính theo % (số lượng tế bào đích sống không có TDB - số lượng tế bào đích sống có TDB) / (số lượng tế bào đích sống không có TDB) X 100.

Các kết quả

A. Sự phong bế PD-1/PD-L1 tăng cường hoạt tính của FcRH5 TDB

Tín hiệu kích thích TCR mạnh có thể dẫn đến hiện tượng phản hồi ức chế miễn dịch mà làm hạn chế hoạt tính tế bào T. Con đường PD-1/PD-L1 là một tác nhân quan trọng của hiện tượng phản hồi này và cơ chế trốn thoát miễn dịch hợp lệ về mặt trị liệu ở một vài chỉ định khối u. PD-L1 thường xuyên được biểu hiện bởi các tế bào khối u u tủy (Gorgun et al. *Amer. Assoc. for Cancer Res.* 21:4607-4618, 2015), và quá trình truyền tín hiệu của nó có thể hạn chế hoạt tính tế bào T ở các bệnh nhân u tủy. PD-1 vắng mặt trong các tế bào T nghỉ, kích thích khi hoạt hóa tế bào T và làm hạn chế hoạt tính tế bào T trong tình trạng lây nhiễm mạn tính (Zou et al. *Science Tran. Med.* 8:328rv324, 2016). Quá trình kích thích 1G7.v85 TDB (48h) của các tế bào CD8+ từ đối tượng cho khỏe mạnh là người khi có mặt các tế bào biểu hiện FcRH5 đã tạo ra mức kích thích PD-1 đáng kể trong các tế bào T (Fig.34). Tín hiệu phản hồi cũng được hoạt hóa *in vivo*. Đã thấy mức tăng đáng kể về các tế bào T dương tính với T PD-1 trong các tế bào T của khỉ cyno ở tất cả các mức liều lượng. Phát hiện ra sự kích thích PD-1 ở cả tế bào CD8+ và tế bào CD4+ trong máu, lá lách, hạch bạch huyết, và tủy xương (Fig.35A-Fig.35B và Fig.36A-Fig.36D).

Khả năng tiêu diệt tế bào đích qua trung gian 1G7.v85 TDB có các tế bào CD8+ được tạo mồi được đánh giá khi có mặt và vắng mặt các chất đối kháng PD-1/PD-L1. Hiệu quả của 1G7.v85 TDB trong việc tạo mồi các tế bào T CD8+ để tiêu diệt các tế bào đích biểu hiện PD-L1 là khiêm tốn (Fig.37A). Việc ngăn chặn sự truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 bằng cách sử dụng kháng thể kháng PD-L1 đã làm tăng một cách đáng kể hiệu quả tiêu diệt qua trung gian 1G7.v85 TDB (Fig.37A). Trong một thử nghiệm cụ thể, các tế bào CD8+ đã được tạo mồi được trộn với các tế bào 293-FcRH5-PD-L1 và được điều trị bằng một mình 1G7.v85 TDB, hoặc ở dạng kết hợp với kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng thể kháng PD-1 (pembrolizumab) (Fig.37B). Phương pháp điều trị kết hợp bằng kháng thể kháng PD-L1 hoặc kháng thể kháng PD-1 (pembrolizumab) làm tăng cường một cách đáng kể độ hiệu nghiệm của 1G7.v85 TDB. EC50 trong cả hai phương pháp điều trị kết hợp đều bằng 0,4ng/ml, trong khi EC50 trong phương pháp điều trị bằng một mình 1G7.v85 TDB là bằng 0,63ng/ml (Fig.37B).

Các kết quả này cho thấy rằng việc hoạt hóa các tế bào T qua trung gian 1G7.v85 TDB dẫn đến việc kích thích PD-1 trong các tế bào T *in vitro* và *in vivo*. Các kết quả này còn cho thấy rằng việc truyền tín hiệu PD-1/PD-L1 có thể hạn chế khả năng tiêu diệt qua trung gian FcRH5 TDB và rằng việc phong bế PD-L1 có thể khắc phục được tình trạng ức chế này và đem đến độ hiệu nghiệm cải thiện. Các dữ liệu này hỗ trợ việc sử dụng FcRH5 TDB ở dạng kết hợp với chất đối kháng liên kết trục PD-1, như kháng thể kháng PD-1 hoặc kháng thể kháng PD-L1.

B. Dexametason làm giảm đáp ứng xytokin liều thứ nhất mà không ảnh hưởng đến hoạt tính FcRH5 TDB

Khả năng tiêu diệt tế bào đích cũng được đánh giá khi có mặt và thiếu vắng dexametason (Dex), một yếu tố của tiêu chuẩn chăm sóc đối với bệnh u tủy mà có các tác dụng ức chế miễn dịch và chống viêm (Fig.38A). IC50 của 1G7.v85 TDB trong dung dịch đệm hoặc trong DMSO lần lượt là 7pM và 6pM. Khi có mặt Dex 0,1μM hoặc Dex 1μM, IC50 của 1G7.v85 TDB lần lượt là 16pM và 25pM. Phương pháp điều trị kết hợp Dex có tác dụng khiêm tốn đối với độ hiệu nghiệm của 1G7.v85 TDB và làm giảm một cách đáng kể các mức IL-2, IL-6, TNF-α, và IFN-γ. Các kết

quả này cho thấy rằng dexametason có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với liệu pháp FcRH5 TDB để giảm nhẹ đáp ứng xytokin liều thứ nhất ở bệnh nhân (Fig.38B).

Ví dụ 6. Sản xuất và thực hiện xét nghiệm FcRH5 bis-Fab

A. Quá trình tạo ra thio-Fab và bản lề-cys-Fab và sản xuất protein

Để tạo ra các mảnh kháng thể có các nhóm sulfhydryl tự do, các cải biến dạng thay thế xystein (Cys) được đưa vào các cấu trúc kháng thể ở các vị trí khác nhau trong miền biến đổi hoặc miền hằng định của chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng bằng quá trình gây đột biến hướng vị trí để tạo ra thio-mAb, như được mô tả trước đây trong tài liệu: Junutula et al. *J. Immunol Methods* 332(1-2):41-52, 2008. Thio-Fab được tạo ra bằng enzym từ các thio-mAb bằng cách pha loãng các thio-mAb này đến 1mg/ml trong Tris 25mM, độ pH = 8,0, sau đó phân giải bằng enzym ở 37°C trong 1 giờ bằng cách sử dụng Lys-C (Wako Chemicals USA, Inc., Richmond, VA) ở tỷ lệ 1:1000 (trọng lượng:trọng lượng) giữa enzym và kháng thể. Làm ngừng quá trình phân giải Lys-C này bằng 5μM chất ức chế proteaza tosyl-L-lysin clometyl keton (TLCK) (Bachem, Torrence, CA) và được tinh chế bằng phương pháp sắc ký trao đổi ion cation trên cột Hi-Trap SP FF 5ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ) bằng cách sử dụng dung dịch đệm natri axetat 50mM và gradien 10 thể tích cột (column volume-CV) NaCl 0-300mM. Thio-Fab sản xuất ra bằng phương pháp này đôi khi được gọi là "thio-Fab enzym" trong bản mô tả này. Theo một phương pháp khác, các cấu trúc ADN mã hóa Fab có gốc Cys đã được xử lý kỹ thuật hoặc các cấu trúc ADN mã hóa các mảnh chuỗi nặng chứa một gốc Cys nguyên thể trong vùng bản lề, được tái tạo dòng vô tính vào các vật truyền biểu hiện plasmit và được biểu hiện một cách trực tiếp trong các tế bào CHO. Thio-Fab sản xuất bằng phương pháp này đôi khi được gọi là "các thio-Fab tái tổ hợp" trong bản mô tả này. Phương pháp thứ ba được sử dụng cho các kháng thể thiếu gốc Cys đã được xử lý kỹ thuật và dựa vào (các) gốc Cys nguyên thể có mặt trong vùng bản lề của lgG. Phương pháp này được sử dụng để tạo ra "bản lề-cys-Fab" và được mô tả chi tiết hơn dưới đây.

Đối với quá trình tạo ra bản lề-cys-Fab từ các kháng thể nguyên thể mà không chứa xystein được xử lý kỹ thuật để sử dụng trong các phản ứng của quá trình tổng

hợp, thì quy trình enzym sau đây, như được trình bày ở ô 1 của Fig.39, được sử dụng. Cả kháng thể ban đầu CD3 và FcRH5 đều được phân giải bằng phương pháp xử lý pepsin (1% trọng lượng/trọng lượng) trong dung dịch đệm natri axetat ở độ pH = 4,5. Sau quá trình phân giải trong 1 giờ, $F(ab')_2$ được phân lập từ hỗn hợp phân giải bằng cách bắt trên nhựa trao đổi cation SP-HP và được tinh chế bằng gradien muối 10 CV của NaCl 0-1M. Sau đó, $F(ab')_2$ được khử trong dung dịch đệm chứa MES 25mm, độ pH = 5,8, EDTA 2mM, và NaCl 300mM. Sau quá trình khử bằng TCEP 1mM, các Fab được oxy hóa, như được trình bày ở ô 2 của Fig.39, bằng cách bổ sung DHAA 5mM để định hình lại disulfua giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ. Thường quan sát thấy rằng, trong các điều kiện phản ứng này, chỉ có disulfua giữa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ là được định hình lại; còn hai gốc xystein trong vùng bản lề vẫn chưa được oxy hóa.

Sau đó, cho hai thiol tự do (các gốc Cys) ở bản lề, như được trình bày ở ô 2 của Fig.39, phản ứng với đương lượng 1M của N-etylmaleimit (NEM) (Sigma Aldrich, St. Louis, MO). Sau đó, cho hỗn hợp thu được chứa Fab đã cải biến một lần, Fab đã cải biến hai lần, và Fab chưa được cải biến, như được trình bày ở ô 3 của Fig.39, phản ứng với một lượng dư của tác nhân liên kết ngang bis-maleimit.

Các điều kiện phản ứng này tạo ra ba sản phẩm: các Fab với một tác nhân liên kết ngang và một NEM, các Fab có hai NEM, và các Fab chứa chỉ một tác nhân liên kết ngang. Các Fab chỉ chứa một tác nhân liên kết ngang được phát hiện ra là không có xystein tự do nào. Vì vậy, trong các điều kiện phản ứng này, một tác nhân liên kết ngang đơn lẻ đã phản ứng một cách rất có hiệu quả với cả hai xystein tạo ra phân tử mà trong đó các xystein đã được vòng hóa bằng tác nhân liên kết ngang. Nguyên liệu bao gồm ba sản phẩm phản ứng trên đây được tinh chế từ hỗn hợp phản ứng (để loại bỏ các hợp phần phản ứng không mong muốn) bằng quá trình lọc gel và được sử dụng để liên hợp vào các bản lề-cys-Fab khác, như được trình bày ở ô 4 của Fig.39, được tạo ra theo phương thức tương tự hoặc thành các thio-Fab. Chỉ có các Cys bản lề-Fab hoặc thio-Fab được tạo ra như được mô tả và chứa một tác nhân liên kết ngang, một maleimit tự do, và một sulfhydryl tự do có thể phản ứng trong các phản ứng bis-Fab của quá trình tổng hợp được mô tả chi tiết dưới đây.

B. Quá trình tinh chế và quá trình biểu hiện protein

Để tạo thuận lợi cho quá trình tinh chế, các Fab được biểu hiện bằng đuôi Flag hoặc đuôi His. Quá trình biểu hiện trong các tế bào CHO được thực hiện bằng các quy trình tiêu chuẩn. Quá trình tinh chế ái lực sau quá trình nuôi cấy tế bào được thực hiện bằng cách sử dụng nhựa mAb kháng Flag hoặc nhựa hạt Niken. Thio-Fab đã được tinh chế được xác định đặc điểm bằng SDS-PAGE và phép đo phổ khối. Các quá trình xác định đặc điểm này thường thể hiện mức tăng khối lượng là 275Da và 306Da. Các mức tăng khối lượng này được phát hiện ra là các sản phẩm cộng disulfua trên xystein không được ghép cặp mà được loại bỏ bằng quá trình khử và oxy hóa để điều chế thio-Fab để liên kết ngang với bis-maleimit. Quá trình khử và oxy hóa thio-Fab được thực hiện như sau. Trước tiên, thio-Fab được khử trong 24 giờ bằng cách bổ sung tris(2-carboxyetyl) phosphin HCl 2mM (TCEP-HCl; còn được gọi là TCEP) (Pierce [Thermo Fisher Scientific], Rockford, IL) trong dung dịch đệm chứa MES 25mM, độ pH = 5,8, NaCl 300ml, và EDTA 5mM. Sau quá trình khử, protein được oxy hóa bằng cách bổ sung axit dehydroascorbic 5mM (DHAA) (Sigma-Aldrich, St. Louis, MO). Thio-Fab đã được phân lập được phân tích bằng SDS-PAGE và phép đo phổ khối để đảm bảo rằng các protein được khử và oxy hóa một cách đúng đắn.

C. Tổng hợp Bis-Fab

Hai loại tác nhân liên kết ngang khác nhau có thể được sử dụng để liên kết theo kiểu cộng hóa trị hai Fab: bis-maleimit và cặp gồm các chất điều hợp DBCO-PEG-maleimit/bromoaxetamit-PEG-Azit.

Quá trình tiếp hợp bằng cách sử dụng tác nhân liên kết ngang bis-maleimit

Trong giai đoạn thứ nhất của quá trình tổng hợp bis-Fab, các thio-Fab hoặc bản lề-cys-Fab có xystein không được ghép cặp được sử dụng. Nhìn chung, thio-Fab hoặc bản lề-cys-Fab là ở trong cùng một dung dịch đệm mà trong đó quá trình khử (Fig.39, ô 1) và oxy hóa (Fig.39, ô 2) được thực hiện (MES, độ pH = 5,8, EDTA 2mM, và NaCl 300mM) ở nồng độ protein là 1mg/ml. Có hai sản phẩm phản ứng không mong muốn tiềm tàng ở giai đoạn này: các dime disulfua và các dime được liên kết ngang. Việc có được nồng độ protein là 1mg/ml ở giai đoạn

này của quá trình tổng hợp là một đặc tính quan trọng của phản ứng bởi vì mức dime hóa được giảm thiểu tối đa ở nồng độ protein đó. Ngoài ra, quá trình kiểm soát phản ứng bằng cách sử dụng dung dịch đệm có độ pH thấp có EDTA đã giúp giảm thiểu tối đa mức dime hóa.

Lượng dư gấp năm lần của tác nhân liên kết ngang bis-maleimit (Quanta BioDesign, Powell, OH) được bổ sung vào hỗn hợp phản ứng, như được trình bày ở ô 3 của Fig.39. Lượng dư gấp năm lần này của tác nhân liên kết ngang cũng có ích trong việc làm giảm thiểu tối đa mức dime hóa không thích hợp. Hỗn hợp phản ứng này được ủ ở nhiệt độ trong phòng (room temperature-RT) hoặc 37°C trong bốn giờ cho đến khi hoàn thành. Sau đó, hỗn hợp này được cô đến thể tích thích hợp cho quá trình lọc gel. Cột S-200 Tricom 22ml (GE Healthcare, Piscataway, NJ) dùng cho quá trình tổng hợp số lượng từ µg đến mg được sử dụng. Bước lọc gel thứ nhất này cho phép loại bỏ tác nhân liên kết ngang chưa được sử dụng tạo ra thio-Fab đã được tinh chế hoặc bản lề-cys-Fab được tiếp hợp vào tác nhân liên kết ngang này. Các điều kiện được mô tả ở trên thường đem lại sản phẩm mong muốn với hiệu suất ít nhất là 90% hoặc lớn hơn. Không có thio-Fab hay bản lề-cys-Fab nào còn lại dưới dạng thiol tự do được tiếp hợp vào tác nhân liên kết ngang hoặc được liên kết bởi disulfua vào một thio-Fab hoặc bản lề-cys-Fab khác thông qua các xystein không được ghép cặp. Sau đó, thio-Fab đã được tinh chế và phân lập (hoặc bản lề-cys-Fab) cộng với các loại tác nhân liên kết ngang được bổ sung vào thio-Fab (hoặc bản lề-cys-Fab) thứ hai và được cô đến mức 5mg/ml trở lên, thường là đến thể tích thích hợp cho quá trình lọc gel, như được trình bày ở ô 4 của Fig.39. Nồng độ protein bằng ít nhất 5mg/ml trong suốt giai đoạn này của quá trình tổng hợp là quan trọng để thúc đẩy phản ứng hoàn thành. Các nồng độ protein thấp hơn dẫn đến việc tạo ra các dime bis-Fab được liên kết ngang chỉ với lượng nhỏ. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, giả thiết rằng đã khắc phục được hiệu ứng không gian hoặc biến số liên quan đến độ nhớt mà cản trở quá trình tạo ra các dime bis-Fab được liên kết ngang bằng cách làm tăng các mức nồng độ của chất phản ứng. Ngoài ra, khoảng nồng độ protein lên đến và bao gồm cả 65mg/ml được kiểm tra. Đã phát hiện ra sự tương quan giữa nồng độ protein và thời gian phản ứng sao cho nồng độ protein càng cao, thì phản ứng đạt đến mức hoàn thành càng nhanh. Sau từ 2-24 giờ ở nhiệt độ trong phòng

hoặc 37°C, phản ứng hoàn thành như được xác định bằng phép đo phổ khối. Nhìn chung, một chất phản ứng còn dư và vẫn chưa được liên hợp trong hỗn hợp cuối cùng.

Quá trình tiếp hợp bằng cách sử dụng DBCO-PEG-maleimit/bromoaxetamit-PEG-Azit

Cho một Fab trong số các Fab đã được tinh chế và khử phong bế phản ứng trong lượng dư 5 mol của DBCO-PEG-maleimit (số 760676, Sigma) trong HEPES 50mM độ pH = 8 trong khi cho Fab kia phản ứng với lượng dư 5 mol của Azit-PEG-maleimit (số 21097 BroadPharm) trong HEPES 50mM độ pH = 8. Sau một giờ ủ ở 37°C, phản ứng này được kiểm tra bằng phép đo phổ khối để xác minh mức hoàn thành phản ứng. Các Fab đã được tiếp hợp được tinh chế từ lượng dư của tác nhân liên kết ngang bằng SEC và kế tiếp, được trộn ở tỷ lệ 1:1 và được điều chỉnh đến nồng độ cao hơn 5mg/ml và được ủ qua đêm ở nhiệt độ trong phòng.

Bất kể loại tác nhân liên kết ngang được sử dụng, phản ứng đã hoàn thành được tinh chế lần nữa bằng quá trình lọc gel; lần này, thu thập đỉnh dime mà chứa bis-Fab 100kD được liên kết ngang theo kiểu không thể đảo ngược thông qua axit amin xystein tự do (trong trường hợp thio-Fab) hoặc thông qua xystein không được ghép cặp nằm trong vùng bản lề (trong trường hợp bản lề-cys-Fab chưa được xử lý kỹ thuật). Tiến độ phản ứng trong suốt cả hai bước thường được theo dõi bằng phép đo phổ khối mà cho thấy một cách rõ ràng sự có mặt của cả hai chất phản ứng và sự tạo thành sản phẩm bis-Fab. Độ tinh khiết của sản phẩm mong muốn sau quá trình lọc gel thứ hai được xác định bằng phép đo phổ khối và SDS-PAGE. Sau quá trình khử và phân tích SDS-PAGE, đã thấy có hiện tượng liên kết ngang không thể đảo ngược được thông qua sự có mặt của vạch 50-kD thể hiện các chuỗi được liên kết ngang không thể khử được. Bằng cách sử dụng quy trình được mô tả ở trên ở quy mô nhỏ, thường đạt được các mức sản lượng tính bằng microgam bởi các số lượng tính bằng microgam của các nguyên liệu ban đầu. Ngoài ra, ở quy mô lớn hơn, thường đạt được các mức sản lượng tính bằng miligam từ các số lượng tính bằng miligam của các nguyên liệu ban đầu.

D. Quá trình tổng hợp bis-Fab hướng đích đến CD3 và FcRH5

Các bis-Fab đặc hiệu kép thu được từ hai kháng thể khác nhau mà hướng đích đến CD3 và FcRH5 được tạo ra. Kháng thể kháng CD3 ban đầu được sử dụng có thể là kháng thể kháng CD3 bất kỳ, như 38E4v.1, 38E4.v11, hoặc 40G5. Theo một phương án, bis-Fab sử dụng 38E4.v1 làm hợp phần kháng CD3, có trình tự chuỗi nhẹ là SEQ ID NO: 134 và trình tự chuỗi nặng là SEQ ID NO: 133. Kháng thể kháng FcRH5 ban đầu được sử dụng cũng có thể là kháng thể kháng FcRH5 bất kỳ, ví dụ, các kháng thể được mô tả trong bản mô tả này như hu1G7.v85 và hu1G7.v87. Cụ thể là, một bis-Fab được lấy làm ví dụ bao gồm trình tự chuỗi nhẹ biến đổi là SEQ ID NO: 105 và trình tự chuỗi nặng biến đổi là SEQ ID NO:104.

Đối với mỗi trong số các kháng thể này, thio-Fab tái tổ hợp được tạo ra trong các tế bào CHO như được mô tả ở trên. Sau đó, các bis-Fab được tổng hợp từ thio-Fab này ở dạng thức tổ hợp bằng cách sử dụng cơ chất tổng hợp, bắt đầu với lượng xấp xỉ 2mg của mỗi thio-Fab. Các thio-Fab khác nhau được kết hợp để tổng hợp bốn phân tử bis-Fab độc nhất. Xấp xỉ một mg của mỗi bis-Fab được thu hồi từ quá trình tổng hợp đối với các ví dụ được thể hiện nhưng các mức sản lượng được mong đợi là sẽ thay đổi tùy thuộc vào các thio-Fab khác nhau. Cho mỗi trong số các bis-Fab này một yếu tố định danh độc nhất. Độ tinh khiết của mỗi bis-Fab được phân tích bằng SDS-PAGE và phép đo phổ khối bằng cách sử dụng các phương pháp tiêu chuẩn đã biết rõ trong lĩnh vực kỹ thuật này.

Bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp cơ chất được mô tả ở trên, một loạt biến thể cấu trúc bis-Fab được tạo ra từ CD3 và biến thể cấu trúc bis-Fab được tạo ra từ FcRH5 được tổng hợp. Bốn điểm gắn kết thio khác nhau được chọn để tổng hợp các bis-Fab; một trong số các vị trí này là ở trong chuỗi nặng của nhánh thio-Fab kháng CD3 (ví dụ, ở vị trí 76 ($Cys76_{HC}$)), một vị trí là ở trong chuỗi nhẹ của nhánh thio-Fab kháng CD3 (ví dụ, ở vị trí 22 ($Cys22_{LC}$)), một trong số các vị trí này là ở trong chuỗi nặng của nhánh thio-Fab kháng FcRH5 (ví dụ, ở vị trí 114 ($Cys114_{HC}$)), và một vị trí là ở trong chuỗi nhẹ của nhánh thio-Fab kháng FcRH5 (ví dụ, ở vị trí 149 ($Cys149_{LC}$)). Các vị trí khác có thể được sử dụng để cài xen các xystein cần thiết. Các Fab chứa các điểm gắn kết thio được tạo ra từ ba nguồn khác

nhau; (1) các thio-mAb có cải biến dạng thay thế xystein mà được phân giải bằng Lysin-C để phóng thích thio-Fab ra khỏi kháng thể, (2) Thio-Fab có cải biến dạng thay thế xystein mà được biểu hiện một cách trực tiếp trong tế bào CHO và được tinh chế từ tế bào CHO, và (3) bản lề-cys-Fab được tạo ra bằng phương pháp enzym được mô tả ở trên dùng để gắn kết một tác nhân liên kết ngang đơn lẻ vào vùng bản lề của kháng thể không được xử lý kỹ thuật sau quá trình phân giải bằng pepsin. Phương pháp này đã đem lại các điểm thay thế khác nhau trong thio-Fab để tái tổ hợp với các thio-Fab khác, vì vậy tạo ra các biến thể cấu trúc (xem Bảng 15).

Bảng 15. Vị trí của Cys đã được xử lý kỹ thuật trong mỗi Fab và số bis-Fab tương ứng

		FcRH5 Fab (1G7.v85)		
		HC A114C	LC A149C	Cys bản lề
CD3 Fab (38E4.v1)	HC S76C	bis-Fab A	bis-Fab C	
	LC N22C	bis-Fab B	bis-Fab D	
	Cys bản lề			$F(ab')_2$ A

E. Hoạt tính sinh học của FcRH5 Bis-Fab

Tiếp theo, mỗi trong số các biến thể cấu trúc bis-Fab được kiểm tra về khả năng liên kết của chúng vào mỗi trong số các kháng nguyên (tức là, CD3 và FcRH5) bằng ELISA. Hợp phần bis-Fab được tạo ra bằng cách liên kết Cys trong vùng bản lề giống với kiểu cấu trúc của kháng thể tự nhiên và đóng vai trò là đối chứng. Trong khi tất cả các cấu trúc bis-Fab đều có khả năng liên kết tương tự vào FcRH5 (Fig.40A), thì hầu hết trong số các bis-Fab này lại thể hiện khả năng liên kết vào CD3 giảm đi so với bis-Fab tham chiếu (Fig.40B). Hoạt tính sinh học được đánh giá trong thử nghiệm hoạt hóa tế bào T *in vitro* mà đóng vai trò là dạng thay thế cho hoạt tính tiêu diệt tế bào T (Fig.41). Thử nghiệm này sử dụng dòng tế bào Jurkat (Jurkat-Dual, Invivogen) được chuyển nhiễm một cách ổn định bằng chất chỉ thị luxiferaza dưới sự kiểm soát của yếu tố phiên mã NF-kB, và ưu điểm của việc sử dụng thử nghiệm này so với thử nghiệm về khả năng tiêu diệt tế bào T là ở chỗ số lượng tế bào có thể được sử dụng không bị hạn chế. Trong các thử nghiệm về khả

năng tiêu diệt tế bào PBMC, số lượng xét nghiệm bị hạn chế ở số lượng tế bào mà có thể thu được từ một đối tượng cho đơn lẻ. Thử nghiệm này được thực hiện như sau. Một dòng tế bào thích hợp, như MOLP-2, được chọn làm tế bào đích và được nuôi cấy đồng thời với các tế bào Jurkat. 10.000 tế bào đích dòng tế bào và 50.000 tế bào tác động (Jurkat) được bổ sung cho mỗi lỗ (10.000 tế bào đích cho mỗi lỗ, tổng thể tích 200µl, có tỷ lệ giữa tế bào đích: tế bào tác động = 1:5), có hoặc không có sự có mặt của bis-Fab. Sau quá trình ủ qua đêm, 10µl dịch nổi trên bề mặt ở các lỗ khác nhau được thử nghiệm về hoạt tính Luxiferaza bằng cách sử dụng 50µl QUANTI-LUC (Invivogen), và mức phát quang được định lượng trong công cụ đo ánh sáng Envision (Perkin Elmer).

Thú vị là, mặc dù các trình tự HVR của mỗi biến thể bis-Fab được tạo ra cho kháng thể kháng CD3 hoặc kháng thể kháng FcRH5 không được thay đổi trong quá trình tạo chính các bis-Fab đó, vẫn quan sát thấy lượng kích thích tế bào T tối đa đối với mỗi bis-Fab thể hiện độ biến thiên, từng bis-Fab một, đơn giản là dựa trên vị trí của dạng liên kết ngang được xử lý kỹ thuật bằng xystein. Không bị ràng buộc bởi lý thuyết, điều này có thể có ngụ ý về cách thức để độc tính và/hoặc độ công hiệu của bis-Fab có thể được điều biến để phù hợp với một nhu cầu chẩn đoán hoặc trị liệu cụ thể. Một quan sát khác là một số bis-Fab (ví dụ, bis-Fab C) có ái lực giảm một cách đáng kể đối với CD3, nhưng có hoạt tính hoạt hóa tế bào T tương đương với hoạt tính hoạt hóa tế bào T của $F(ab')_2$ A tham chiếu (Fig.40B và Fig.41, Bảng 15).

F. Hoạt tính sinh học của FcRH5 bis-Fab có sử dụng các tế bào B nội sinh của người

Mỗi biến thể bis-Fab được kiểm tra về độ hiệu nghiệm sinh học của nó trong thử nghiệm về khả năng tiêu diệt của bis-Fab phụ thuộc vào tế bào T đối với quá trình tiêu diệt tế bào B nội sinh ngoại vi, như sau: 200.000 hPBMC đã được phân lập từ mỗi trong số ba đối tượng cho khỏe mạnh được bổ sung vào mỗi lỗ có hoặc không có bis-Fab. Sau 48 giờ ủ, các tế bào được nhuộm bằng kháng nguyên bề mặt tế bào thích hợp của dòng tế bào đích (tế bào B = CD20) (5 µl/lỗ) và propidi iodua dùng cho phương pháp đánh giá khả năng sống của tế bào và sau đó được phân tích bằng FACS. Các hoạt tính tiêu diệt phụ thuộc vào bis-Fab được tính toán theo

phương trình sau đây: khả năng tiêu diệt tính theo % = (1- số lượng tế bào sống có bis-Fab/số lượng tế bào sống không có bis-Fab) x 100. Trong vai trò là đối chứng dương, $F(ab')_2$ được sử dụng, kháng thể này được tạo ra từ kháng thể FcRH5 TDB "chốt vào trong lỗ" trong đó nhánh kháng CD3 và nhánh kháng FcRH5 của mỗi Fab có trình tự giống như những loại được sử dụng cho các bis-Fab được kiểm tra (ngoại trừ khi không có các đột biến điểm được xử lý kỹ thuật bằng xystein) (ví dụ, xem tài liệu: Ridgway et al. *Protein Eng.,* 9:617-621, 1996). Nhìn chung, các kết quả đã cho thấy khả năng tái lập, mặc cho việc sử dụng các tế bào từ đối tượng cho khác nhau.

Lượng FcRH5 bis-Fab được kiểm tra trong bản mô tả này mà cần thiết cho quá trình phân giải một nửa mức tối đa của các tế bào B nội sinh ngoại vi của người, hoặc trị số độ công hiệu EC50 được biểu đạt bằng ng/ml, được tính toán đối với mỗi bis-Fab được kiểm tra trên đây. Về tổng thể, đã được kỳ vọng là các xu hướng về độ công hiệu của mỗi bis-Fab được kiểm tra trong thử nghiệm tế bào B nội sinh của người sẽ theo các kết quả được xác định trong thử nghiệm ELISA được mô tả ở trên (Fig.40A-Fig.40B).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể kháng FcRH5, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm miền liên kết bao gồm sáu HVR sau đây:

(a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1;

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8;

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9;

(d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12;

(e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và

(f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23.

2. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 1, trong đó miền liên kết này bao gồm (a) miền biến đổi chuỗi nặng (VH) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104; (b) miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) bao gồm trình tự axit amin có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 95% với trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105; hoặc (c) miền VH như theo (a) và miền VL như theo (b).

3. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 1, trong đó kháng thể này còn bao gồm các vùng khung của vùng biến đổi chuỗi nặng (FR) sau đây:

(a) FR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 52;

(b) FR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 54;

(c) FR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 46; và

(d) FR-H4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 47.

4. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 3, trong đó miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104.

5. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 1, trong đó kháng thể này còn bao gồm các FR của vùng biến đổi chuỗi nhẹ sau đây:

(a) FR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 48;

(b) FR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 57;

(c) FR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 50; và

(d) FR-L4 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 51.

6. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 5, trong đó miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105.

7. Kháng thể kháng FcRH5, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm miền liên kết bao gồm (a) miền VH bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 104 và (b) miền VL bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 105.

8. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm đột biến vị trí không glycosyl hóa.

9. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này là kháng thể đa đặc hiệu.

10. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 9, trong đó kháng thể đa đặc hiệu này là kháng thể đặc hiệu kép.

11. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 10, trong đó kháng thể đặc hiệu kép này bao gồm miền liên kết thứ hai mà liên kết cụm biệt hóa 3 (CD3).

12. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 11, trong đó miền liên kết thứ hai này liên kết vào epitop trên CD3 bao gồm gốc axit amin Glu6 của CD3.

13. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 12, trong đó miền liên kết thứ hai này có khả năng liên kết vào polypeptit CD3 của người hoặc polypeptit CD3 của khỉ cyno.

14. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 11, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm sáu HVR sau đây:

(a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115;

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116;

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 117;

(d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118;

(e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và

(f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 120.

15. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 11, trong đó miền liên kết thứ hai này bao gồm sáu HVR sau đây:

(a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 155;

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 156;

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 157;

(d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 158;

(e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 159; và

(f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 160.

16. Kháng thể kháng FcRH5 mà liên kết vào FcRH5 và CD3, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này bao gồm nhánh kháng FcRH5 bao gồm miền liên kết thứ nhất bao gồm sáu HVR sau đây:

(a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 1;

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 8;

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 9;

(d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 12;

(e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 16; và

(f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 23; và

nhánh kháng CD3 bao gồm miền liên kết thứ hai bao gồm sáu HVR sau đây:

(a) HVR-H1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 115;

(b) HVR-H2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 116;

(c) HVR-H3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 121;

(d) HVR-L1 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 118;

(e) HVR-L2 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 119; và

(f) HVR-L3 bao gồm trình tự axit amin là SEQ ID NO: 123.

17. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 1, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 10ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày.

18. Thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 1 và chất gây độc tế bào.

19. Chế phẩm bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 1.

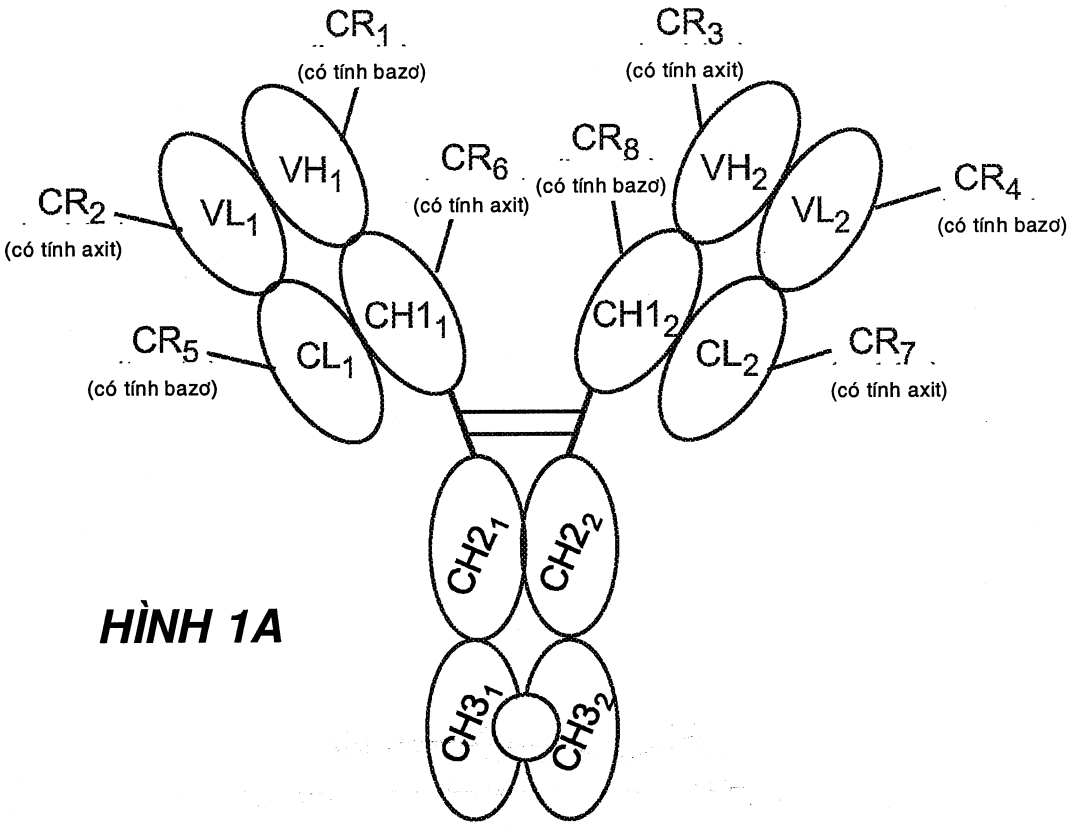
20. Chế phẩm theo điểm 19, trong đó chế phẩm này là dược phẩm.

21. Kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 16, trong đó kháng thể kháng FcRH5 này có mức thanh thải sau khi tiêm trong tĩnh mạch nằm trong khoảng từ 10ml/kg/ngày đến 35ml/kg/ngày.

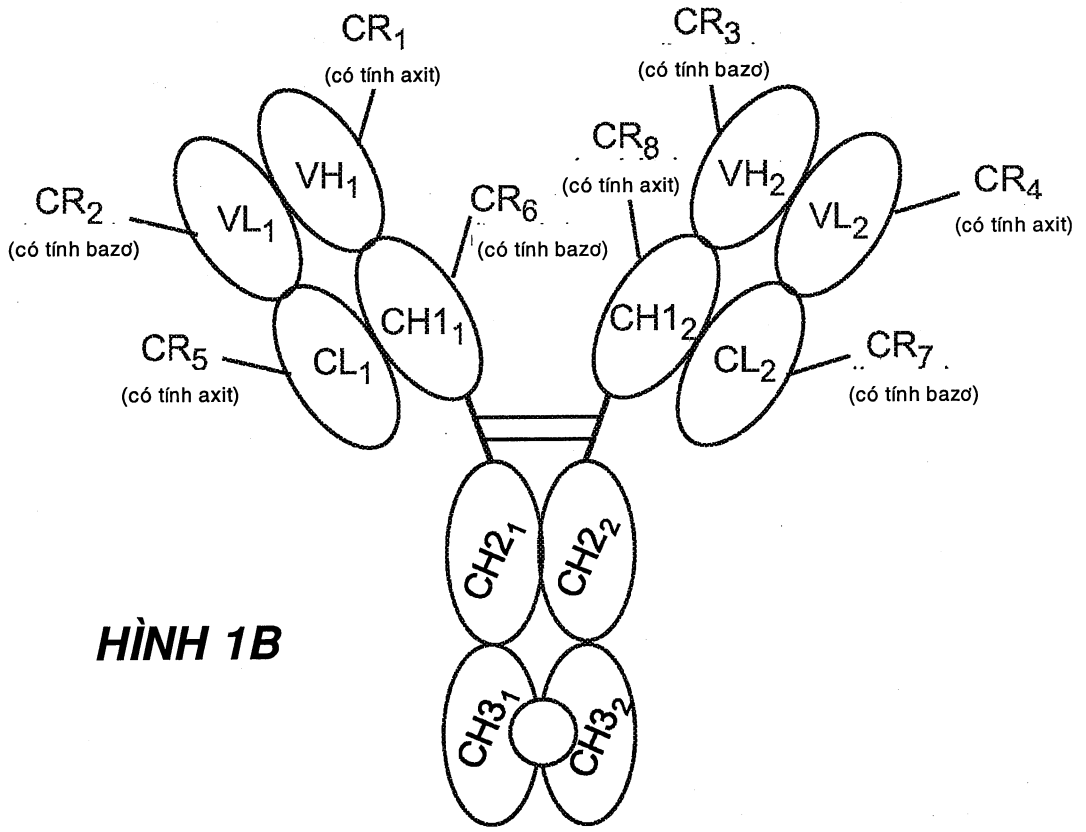
22. Thể tiếp hợp miễn dịch bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 16 và chất gây độc tế bào.

23. Chế phẩm bao gồm kháng thể kháng FcRH5 theo điểm 16.

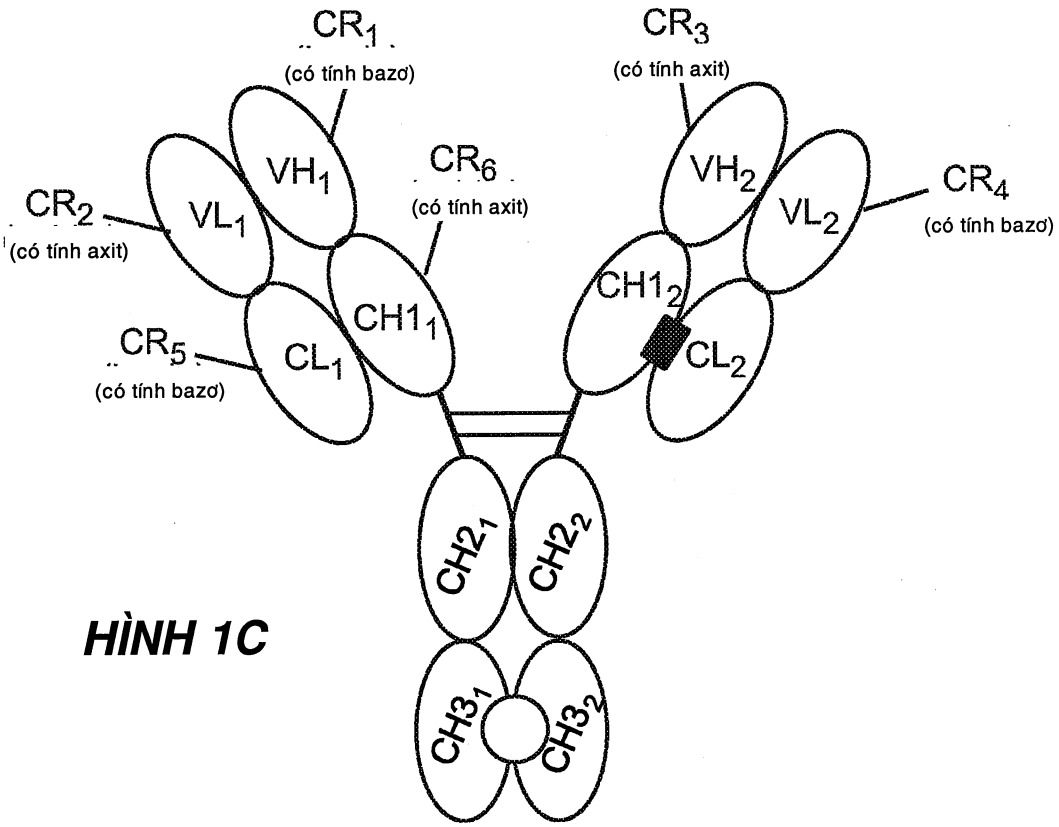
24. Chế phẩm theo điểm 23, trong đó chế phẩm này là dược phẩm.



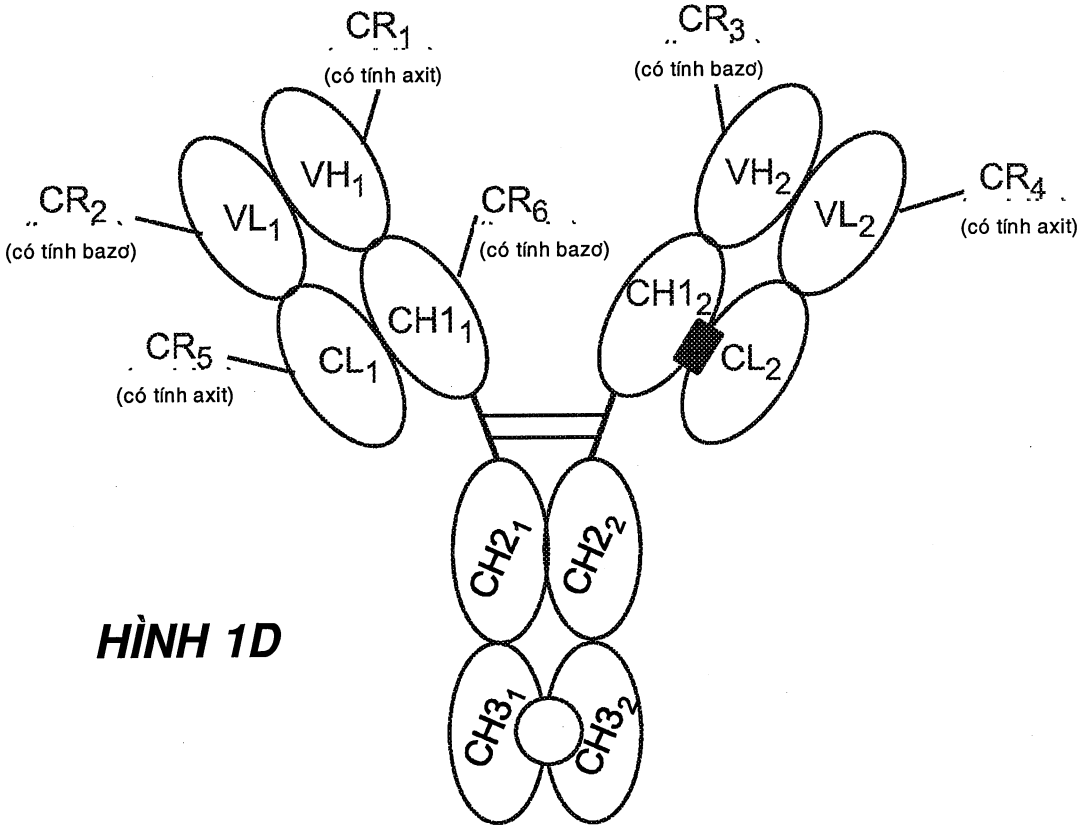
HÌNH 1A



HÌNH 1B



HÌNH 1C



HÌNH 1D

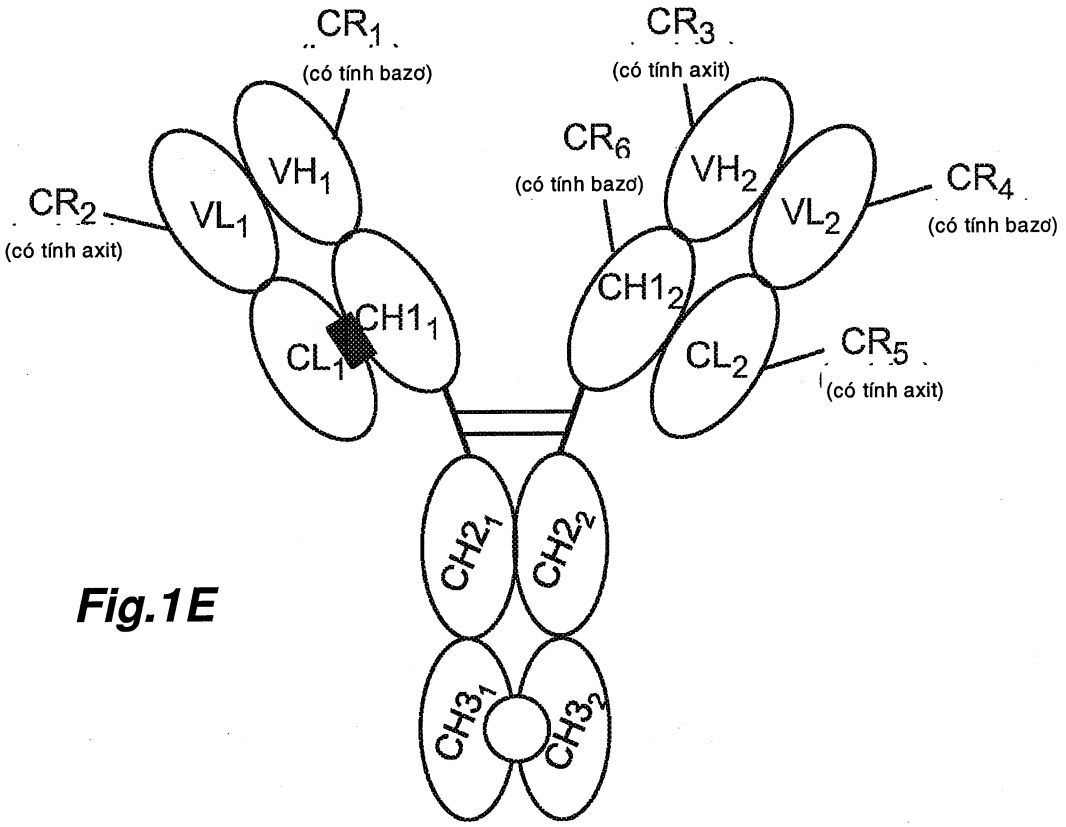

CR1
(có tính bazơ)
CR3
(có tính axit)
CR6
(có tính bazơ)
VH1
VH2
CR2
(có tính axit)
VL1
VL2
CR4
(có tính bazơ)
CH11
CH12
CL1
CL2
CR5
(có tính axit)
CH21
CH22
CH31
CH32

Fig.1E

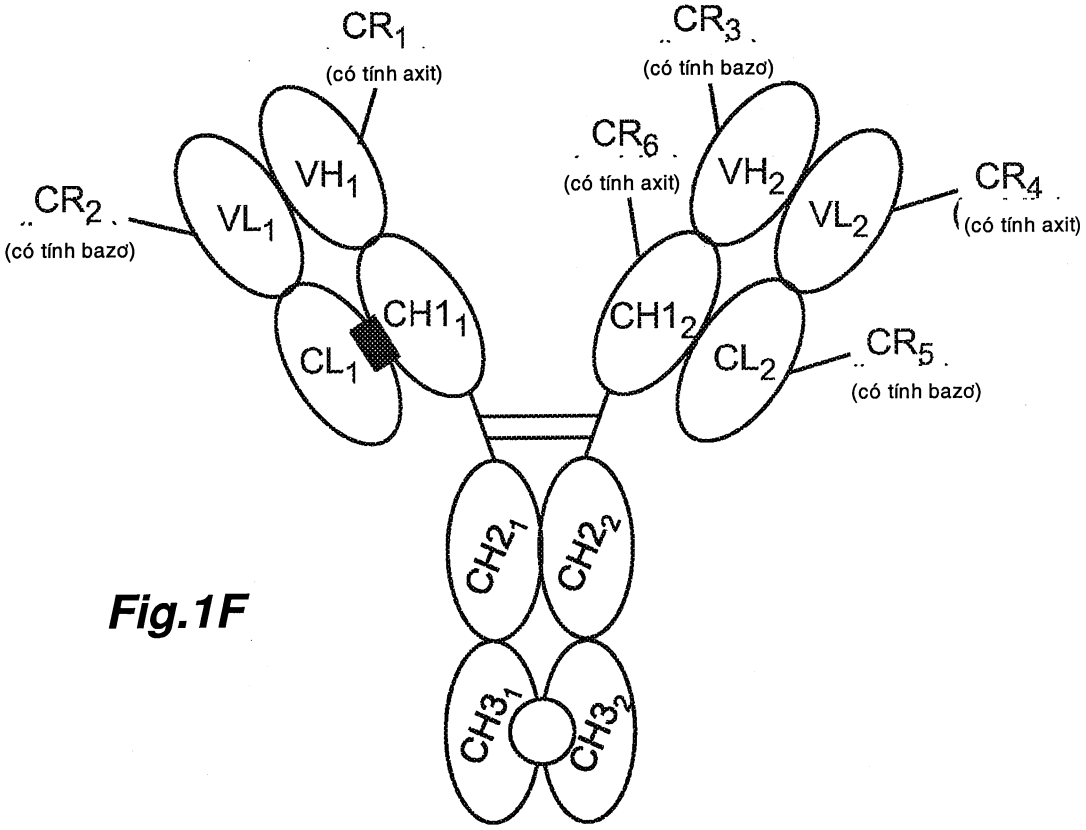

CR1
(có tính axit)
CR3
(có tính bazơ)
CR6
(có tính axit)
VH1
VH2
CR2
(có tính bazơ)
VL1
VL2
CR4
(có tính axit)
CH11
CH12
CL1
CL2
CR5
(có tính bazơ)
CH21
CH22
CH31
CH32

Fig.1F

Fig.2

Miền biến đổi chuỗi nhẹ

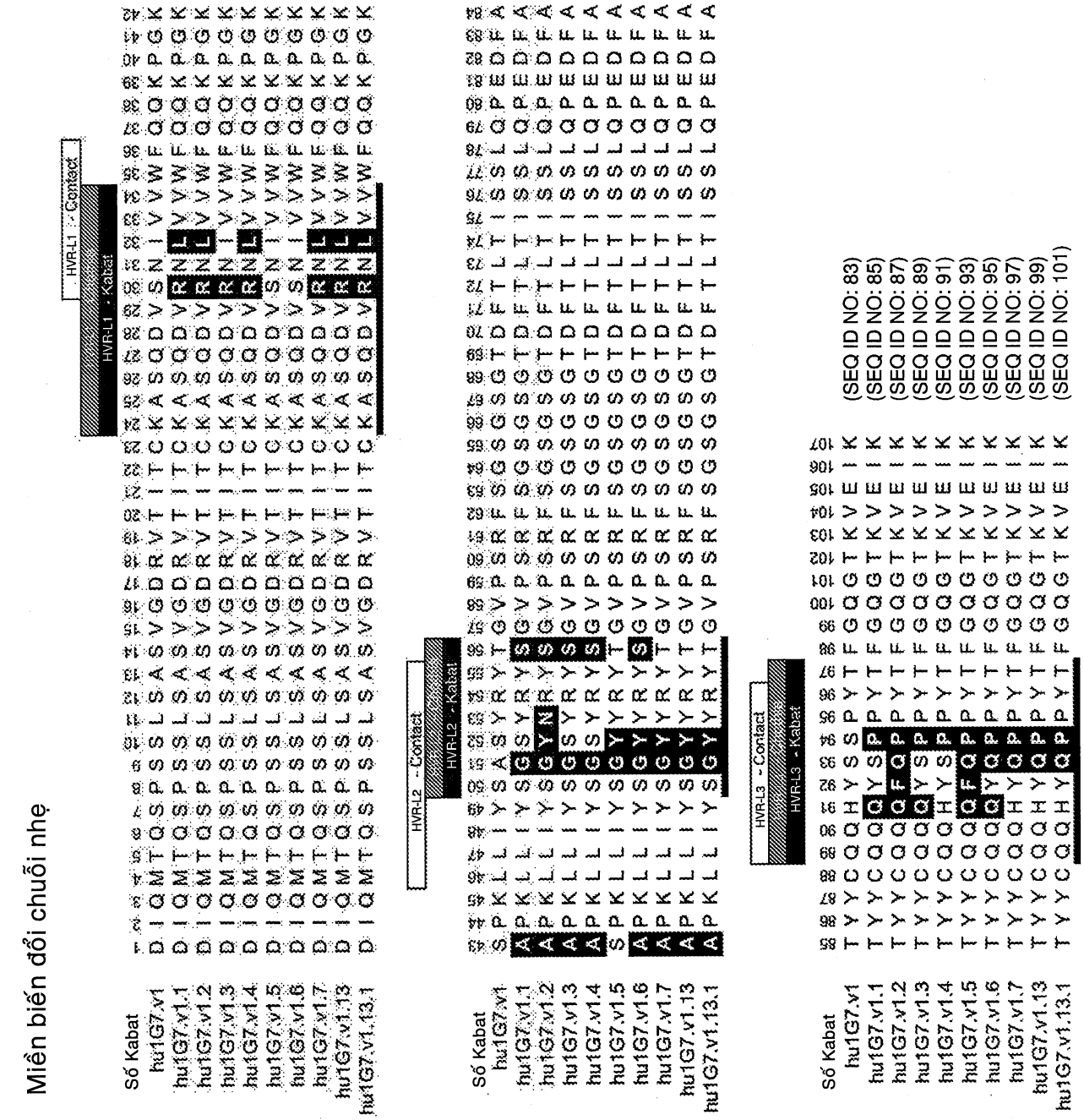
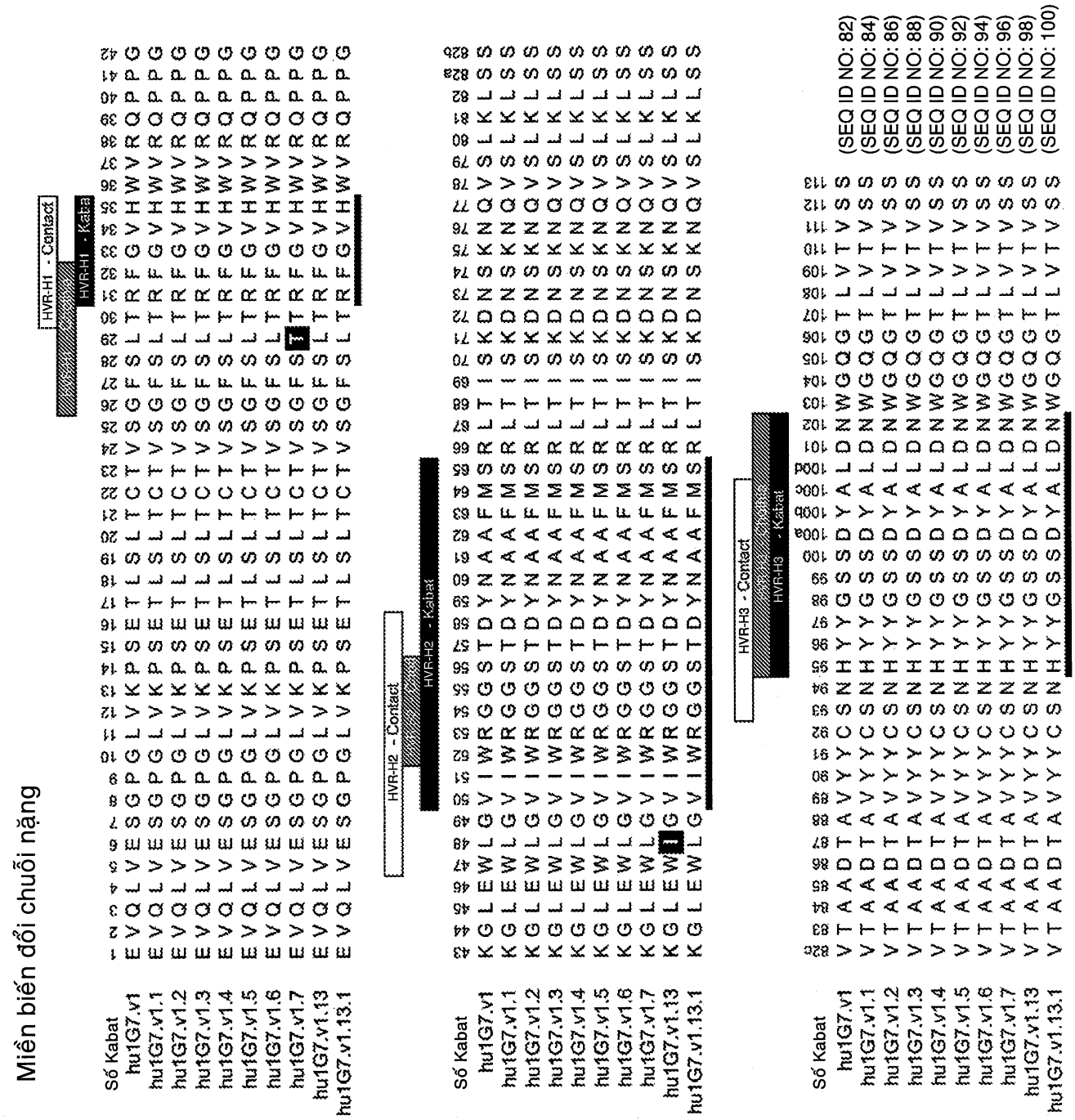


Fig.3


Miền biến đổi chuỗi nặng
HVR-H1 - Contact
HVR-H1 - Kabat
HVR-H2 - Contact
HVR-H2 - Kabat
HVR-H3 - Contact
HVR-H3 - Kabat
Số Kabat
hu1G7.v1
hu1G7.v1.1
hu1G7.v1.2
hu1G7.v1.3
hu1G7.v1.4
hu1G7.v1.5
hu1G7.v1.6
hu1G7.v1.7
hu1G7.v1.13
hu1G7.v1.13.1
(SEQ ID NO: 82)
(SEQ ID NO: 84)
(SEQ ID NO: 86)
(SEQ ID NO: 88)
(SEQ ID NO: 90)
(SEQ ID NO: 92)
(SEQ ID NO: 94)
(SEQ ID NO: 96)
(SEQ ID NO: 98)
(SEQ ID NO: 100)

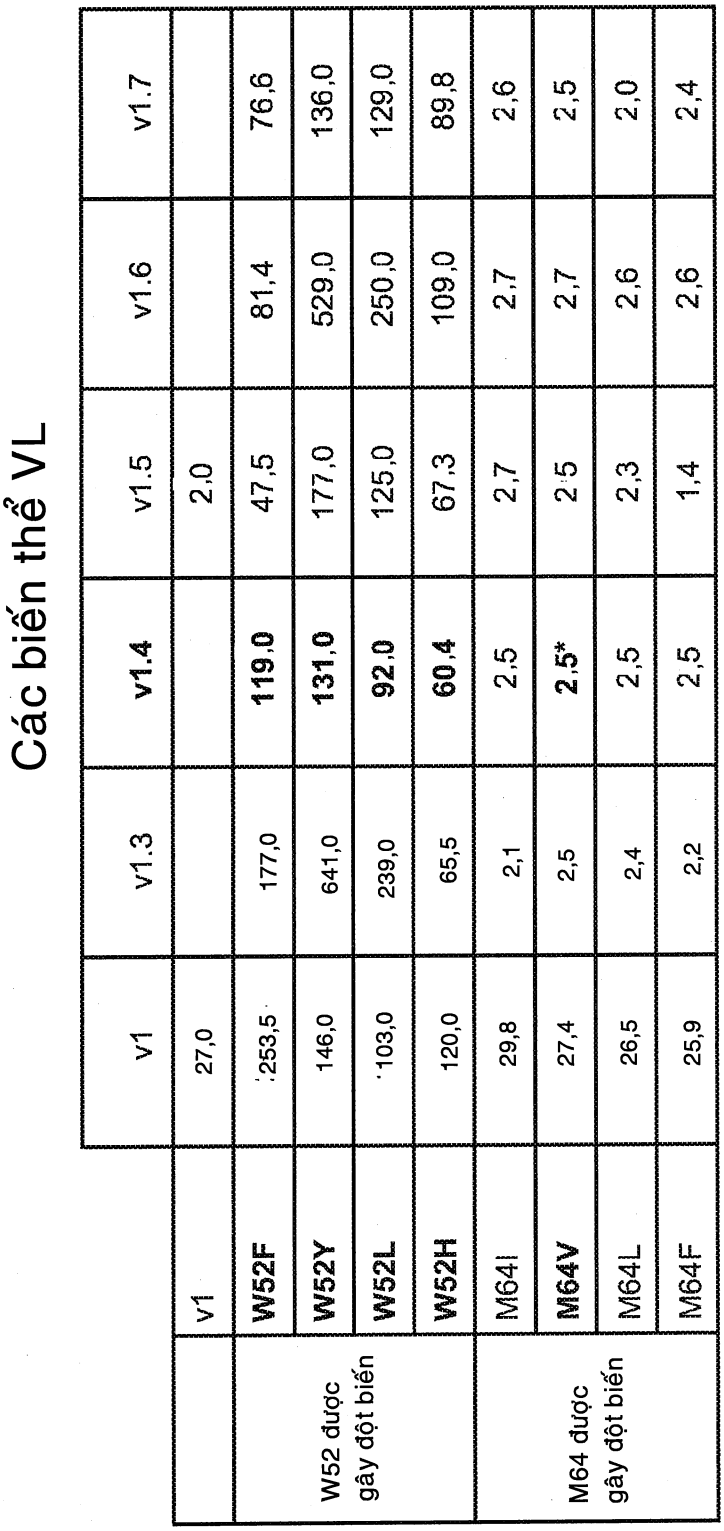

Các biến thể VL
Các biến thể VH
W52 được gây đột biến
M64 được gây đột biến
v1
v1.3
v1.4
v1.5
v1.6
v1.7
27,0
2,0
W52F
253,5
177,0
119.0
47,5
81,4
76,6
W52Y
146,0
641,0
131.0
177,0
529,0
136,0
W52L
103,0
239,0
92,0
125,0
250,0
129,0
W52H
120,0
65,5
60,4
67,3
109,0
89,8
M64I
29,8
2,1
2,5
2,7
2,7
2,6
M64V
27,4
2,5
2,5*
2,5
2,7
2,5
M64L
26,5
2,4
2,5
2,3
2,6
2,0
M64F
25,9
2,2
2,5
1,4
2,6
2,4
* 1G7.v85

Fig.4

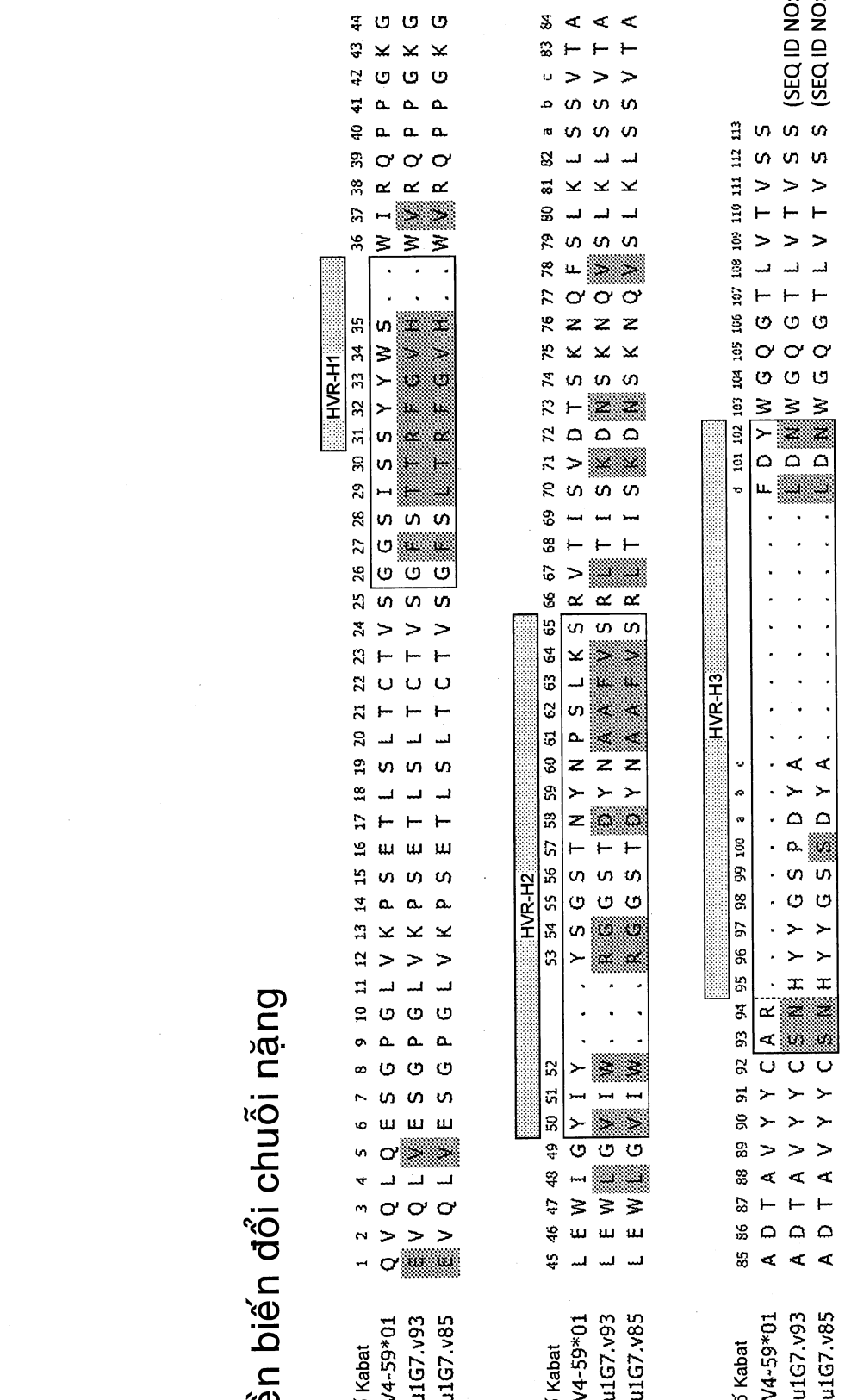

Miền biến đổi chuỗi nặng
HVR-H1
HVR-H2
HVR-H3
Số Kabat
hIGHV4-59*01
hu1G7.v93
hu1G7.v85
(SEQ ID NO: 106)
(SEQ ID NO: 104)

Fig.5A

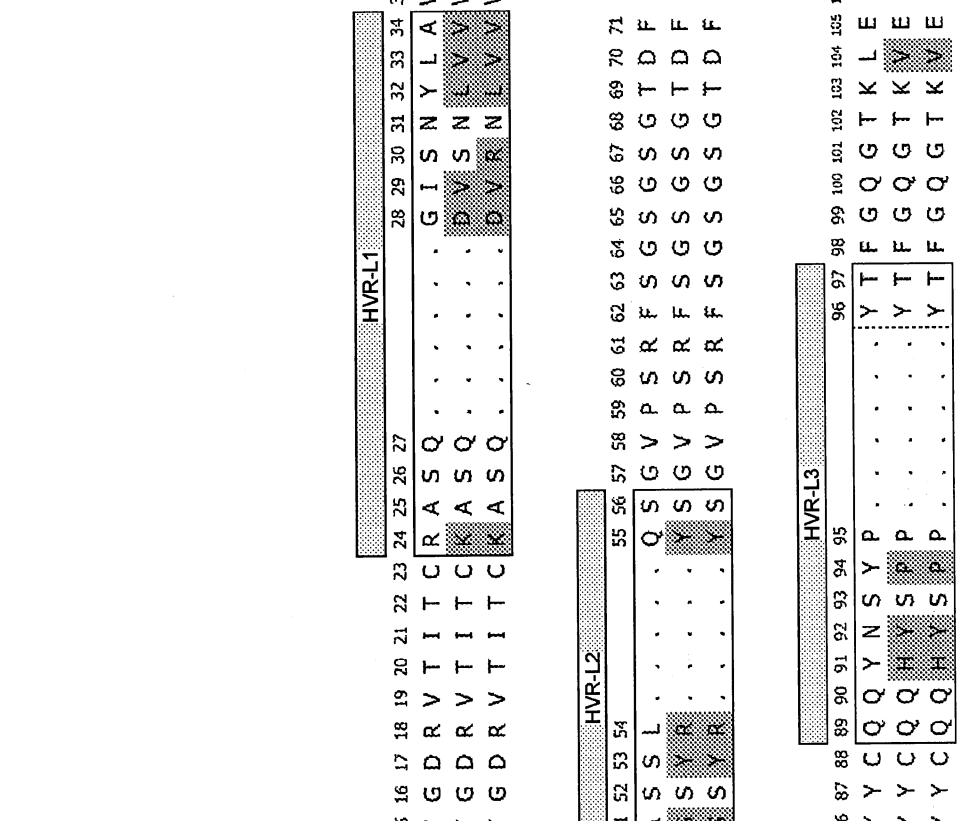
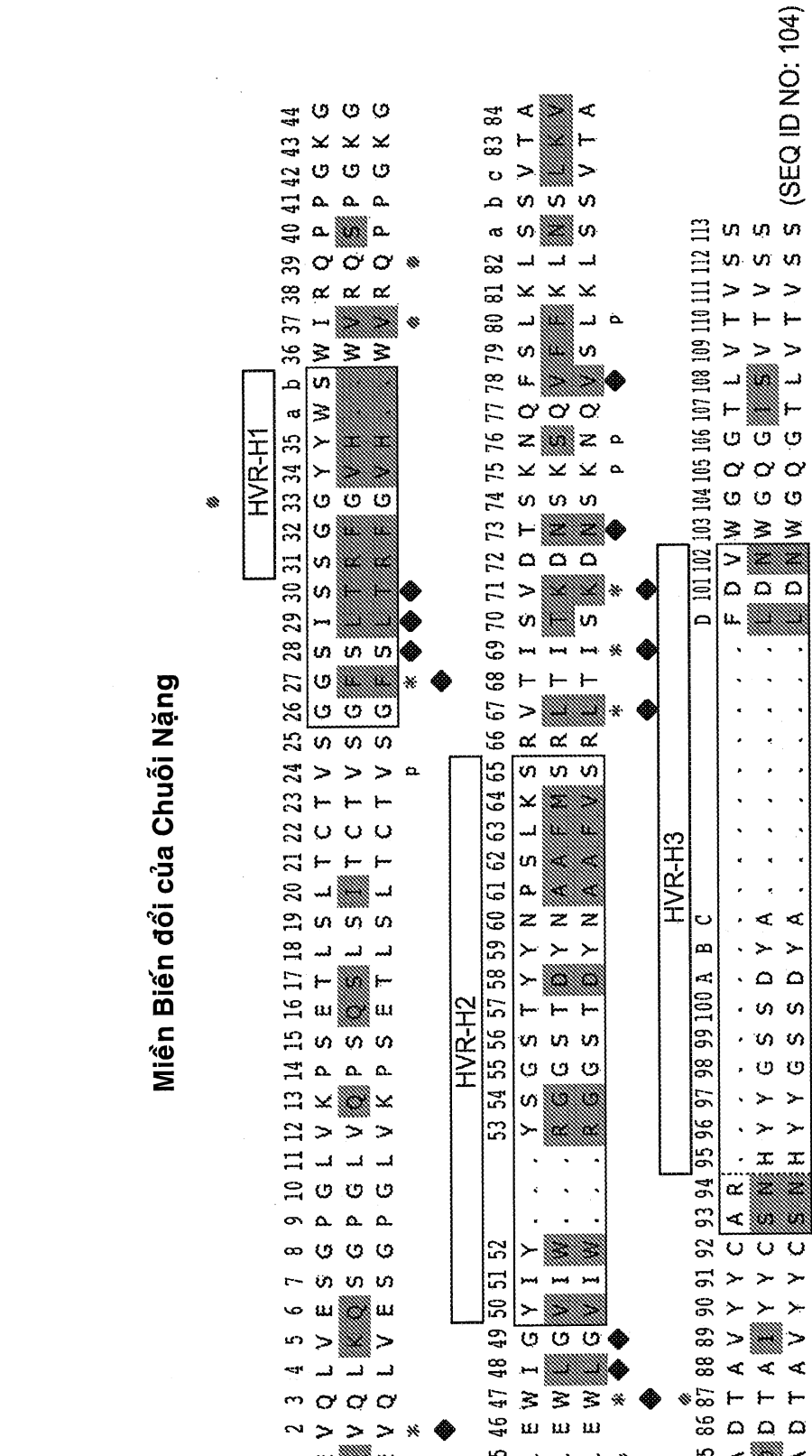

Miền biến đổi chuỗi nhẹ
HVR-L1
HVR-L2
HVR-L3
Số Kabat
hIGKV1-16*01
hu1G7.v93
hu1G7.v85
(SEQ ID NO: 107)
(SEQ ID NO: 105)

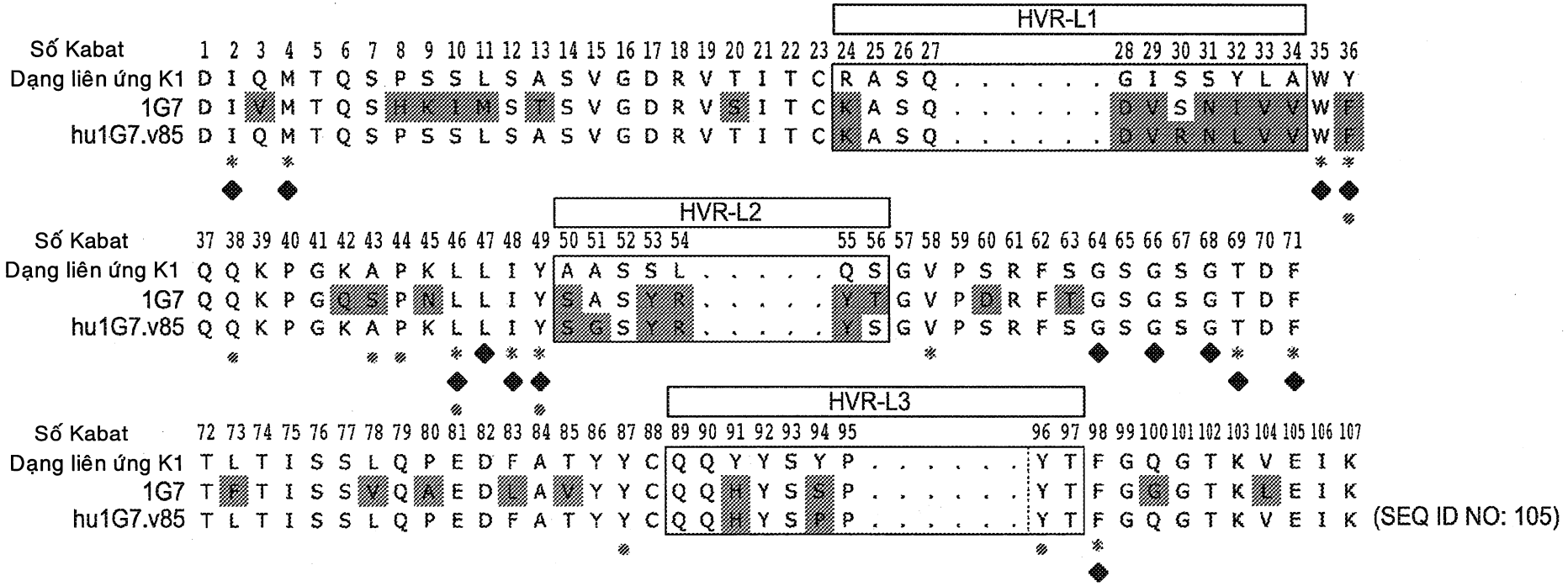
Fig.5B



(SEQ ID NO: 104)

HÌNH 6A

Miền Biến đổi của Chuỗi Nhẹ



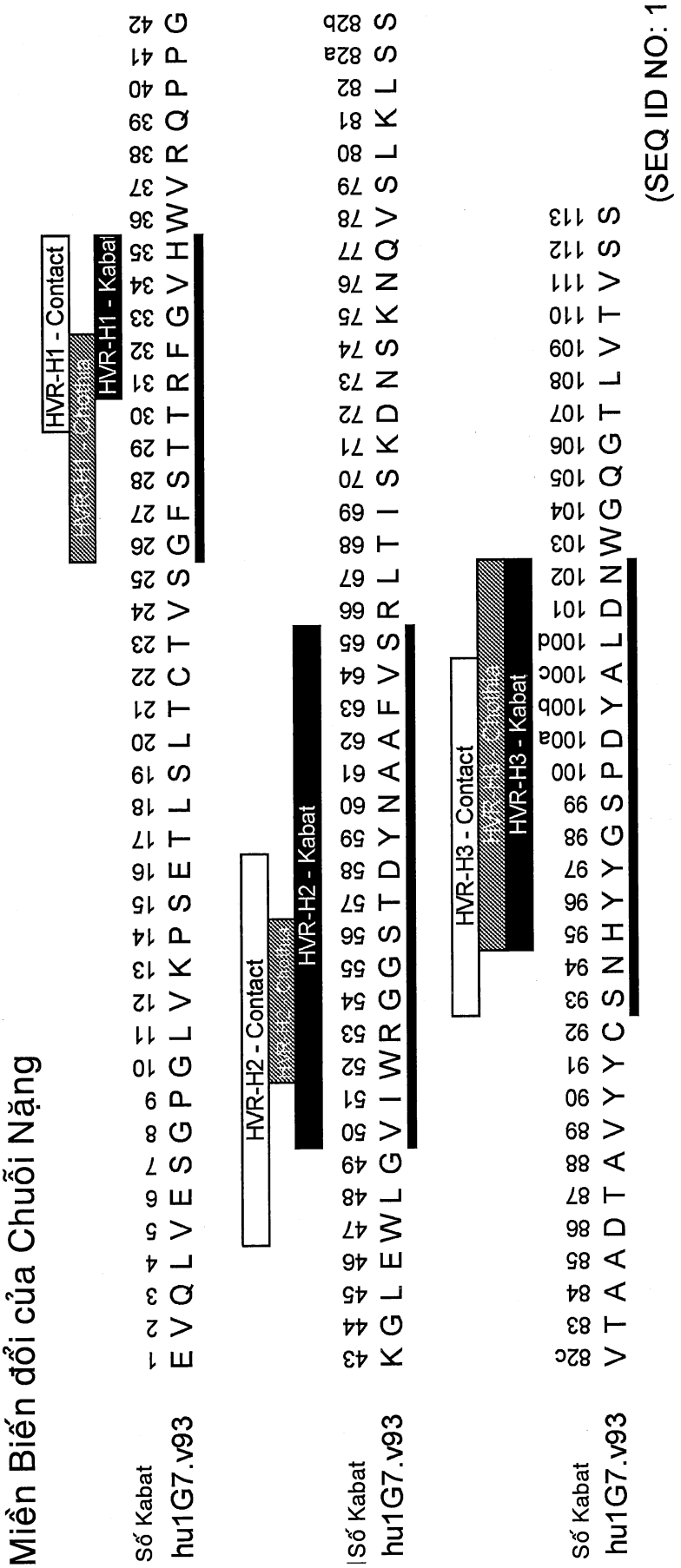
(SEQ ID NO: 105)

◆ Các vị trí Vernier; Foote and Winter JMB (1992) 224:487

※ Các tương tác FW-CDR; Padlan Mol. Immunol. (1994) 31:169

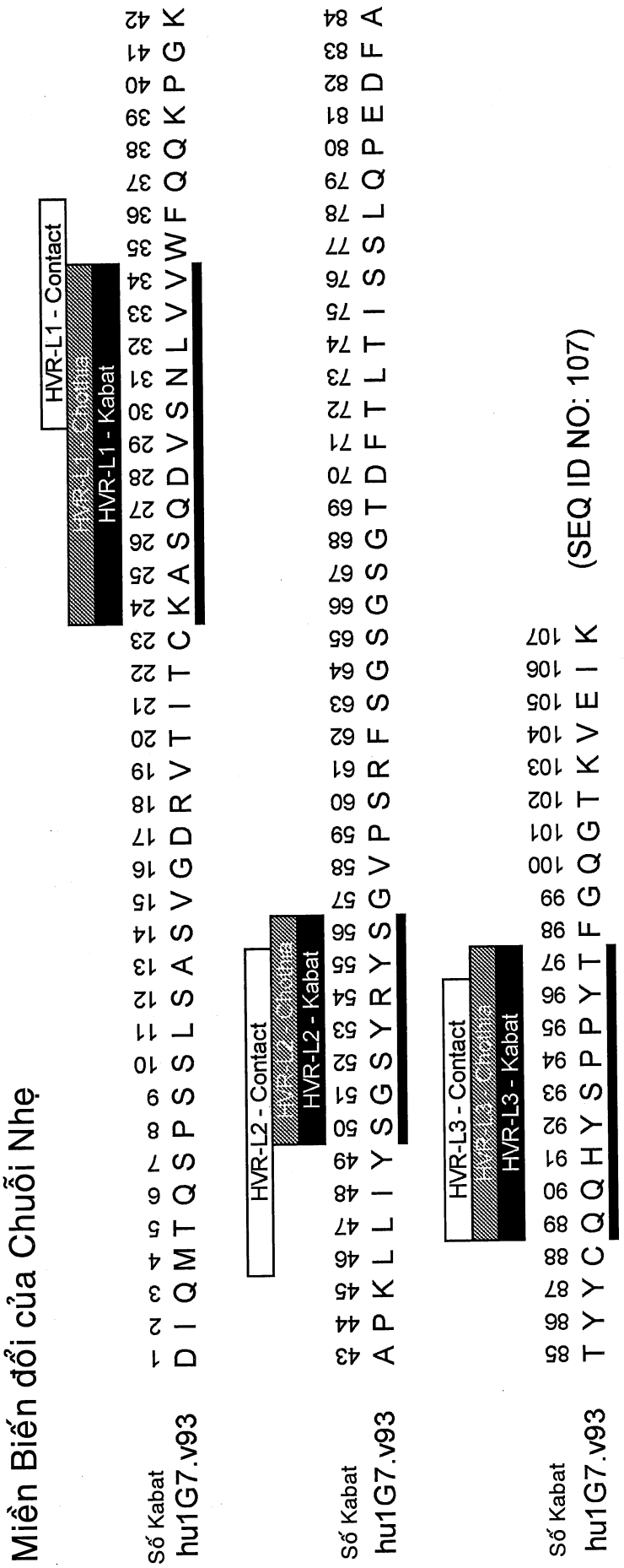
〃 Các tương tác VH-VL; Padlan Mol. Immunol. (1994) 31:169

HÌNH 6B

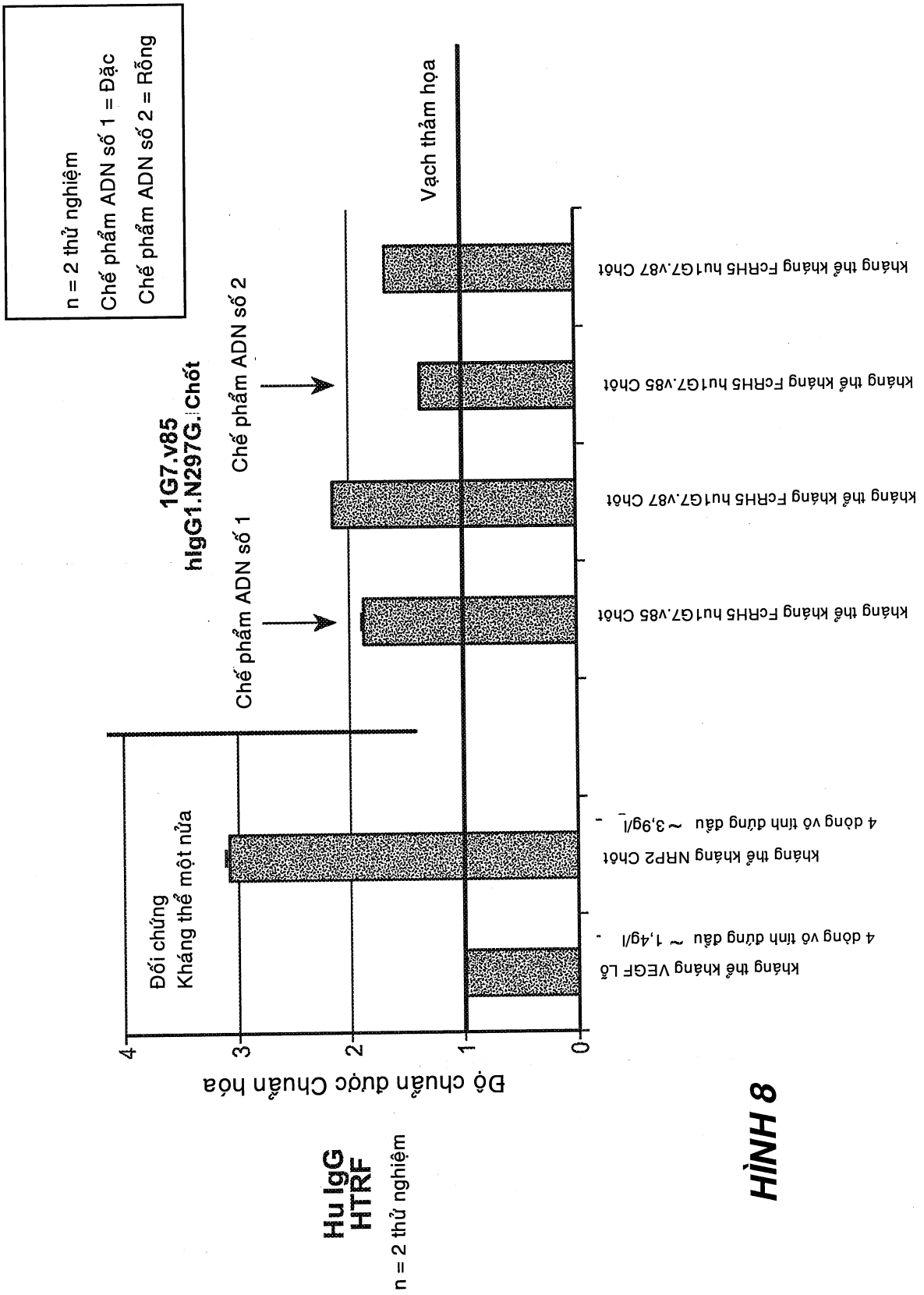


(SEQ ID NO: 106)

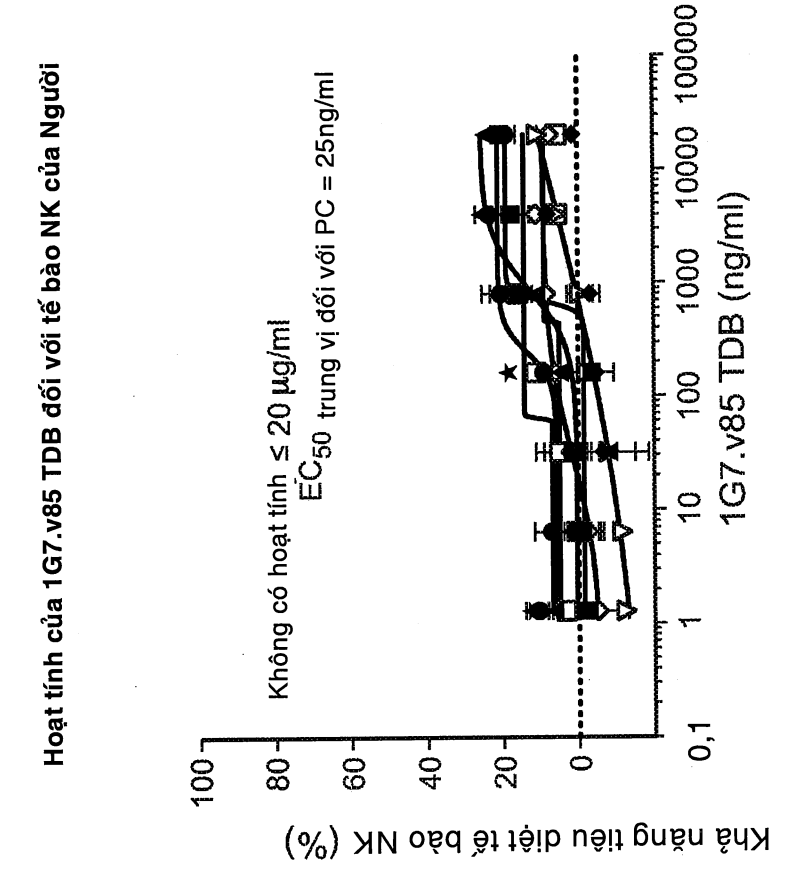
HÌNH 7A


Miền Biến đổi của Chuỗi Nhẹ
HVR-L1 - Contact
HVR-L1 - Chothia
HVR-L1 - Kabat
HVR-L2 - Contact
HVR-L2 - Chothia
HVR-L2 - Kabat
HVR-L3 - Contact
HVR-L3 - Chothia
HVR-L3 - Kabat
Số Kabat
hu1G7.v93
D I Q M T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C K A S Q D V S N L V V W F Q Q K P G K
A P K L L I Y S G S Y R Y S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D F A
T Y Y C Q Q H Y S P P Y T F G Q G T K V E I K
(SEQ ID NO: 107)

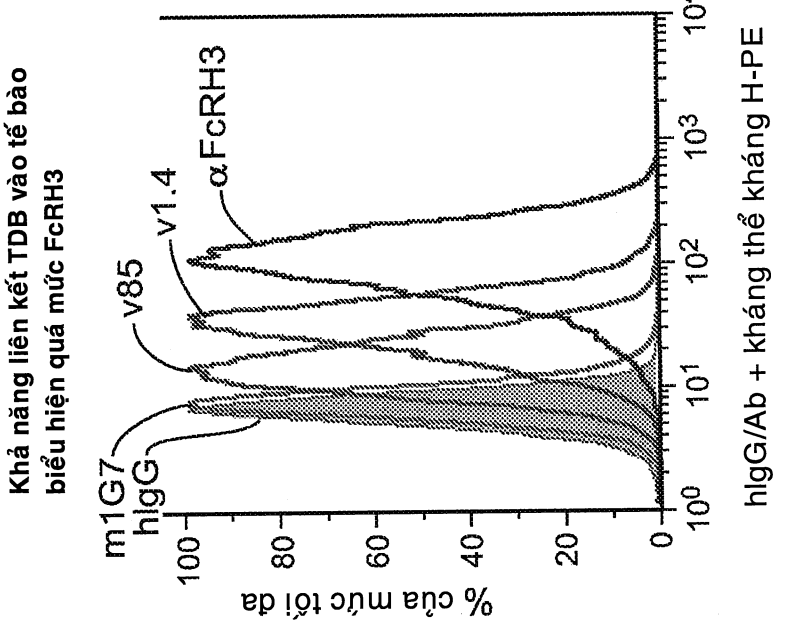
HÌNH 7B


Hu IgG
HTRF
n = 2 thử nghiệm
Độ chuẩn được Chuẩn hóa
4
3
2
1
0
Đối chứng
Kháng thể một nửa
1G7.v85
hIgG1.N297G.Chốt
Chế phẩm ADN số 1
Chế phẩm ADN số 2
Vạch thảm họa
n = 2 thử nghiệm
Chế phẩm ADN số 1 = Đặc
Chế phẩm ADN số 2 = Rỗng
kháng thể kháng VEGF Lỗ
4 dòng vô tính đứng đầu ~ 1,4g/l
kháng thể kháng NRP2 Chốt
4 dòng vô tính đứng đầu ~ 3,9g/l
kháng thể kháng FcRH5 hu1G7.v85 Chốt
kháng thể kháng FcRH5 hu1G7.v87 Chốt
kháng thể kháng FcRH5 hu1G7.v85 Chốt
kháng thể kháng FcRH5 hu1G7.v87 Chốt

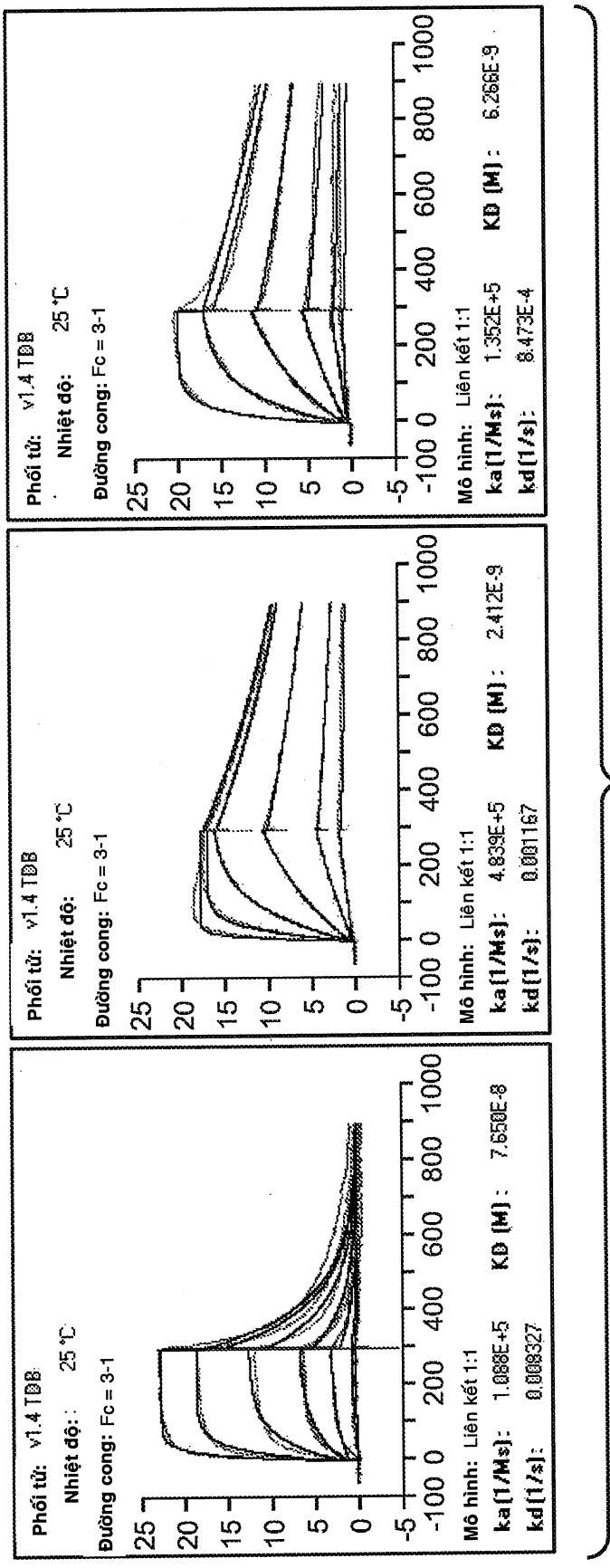
HÌNH 8



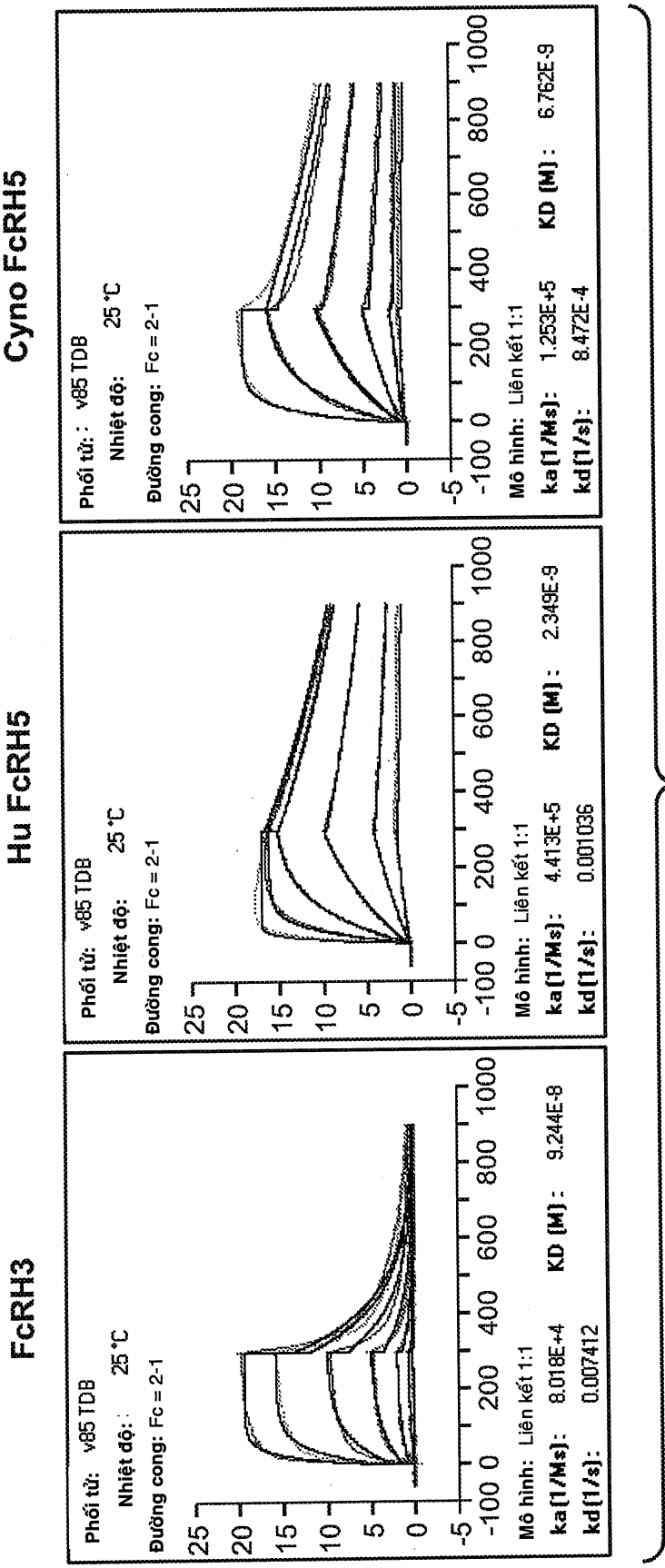
HÌNH 9B



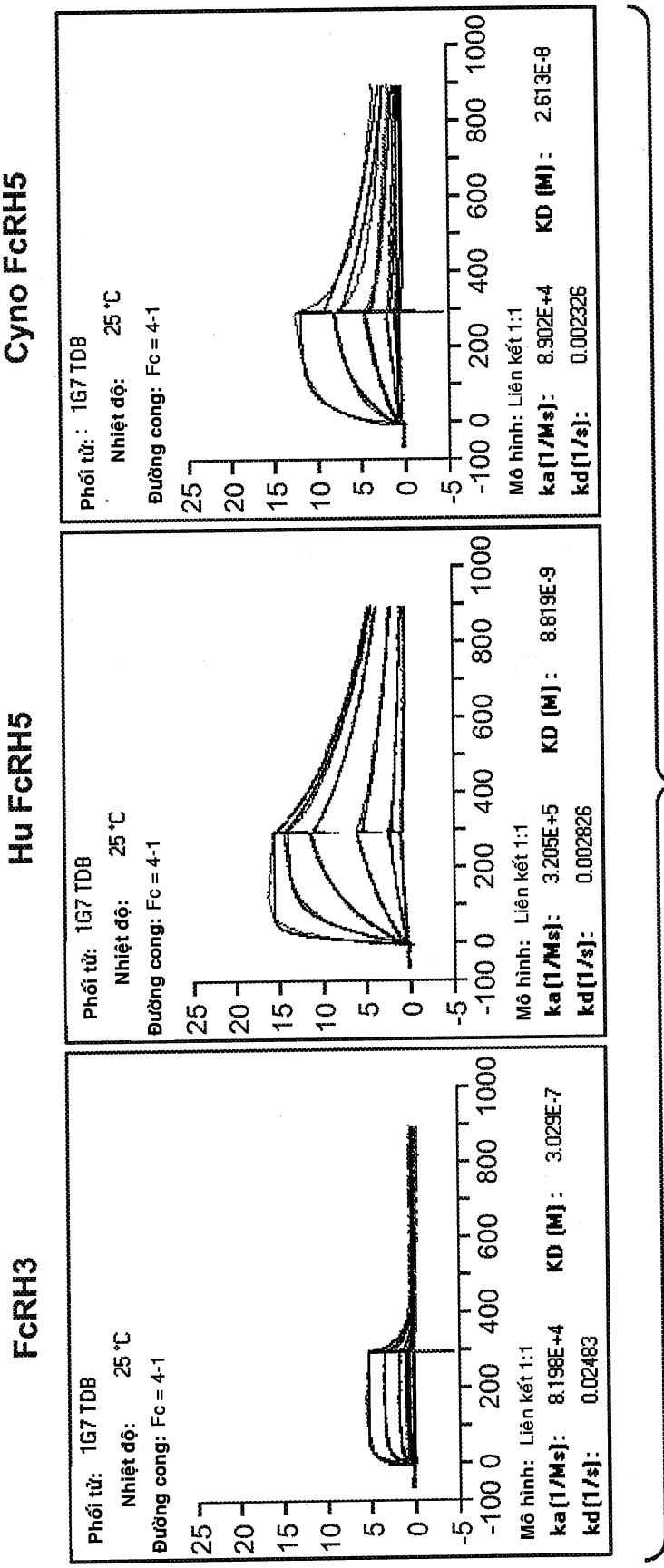
HÌNH 9A


FcRH3
Hu FcRH5
Cyno FcRH5
Phối tử: v1.4 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 3-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka[1/Ms]: 1.088E+5
KD [M]: 7.650E-8
kd[1/s]: 0.008327
Phối tử: v1.4 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 3-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka[1/Ms]: 4.839E+5
KD [M]: 2.412E-9
kd[1/s]: 0.001167
Phối tử: v1.4 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 3-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka[1/Ms]: 1.352E+5
KD [M]: 6.266E-9
kd[1/s]: 8.473E-4

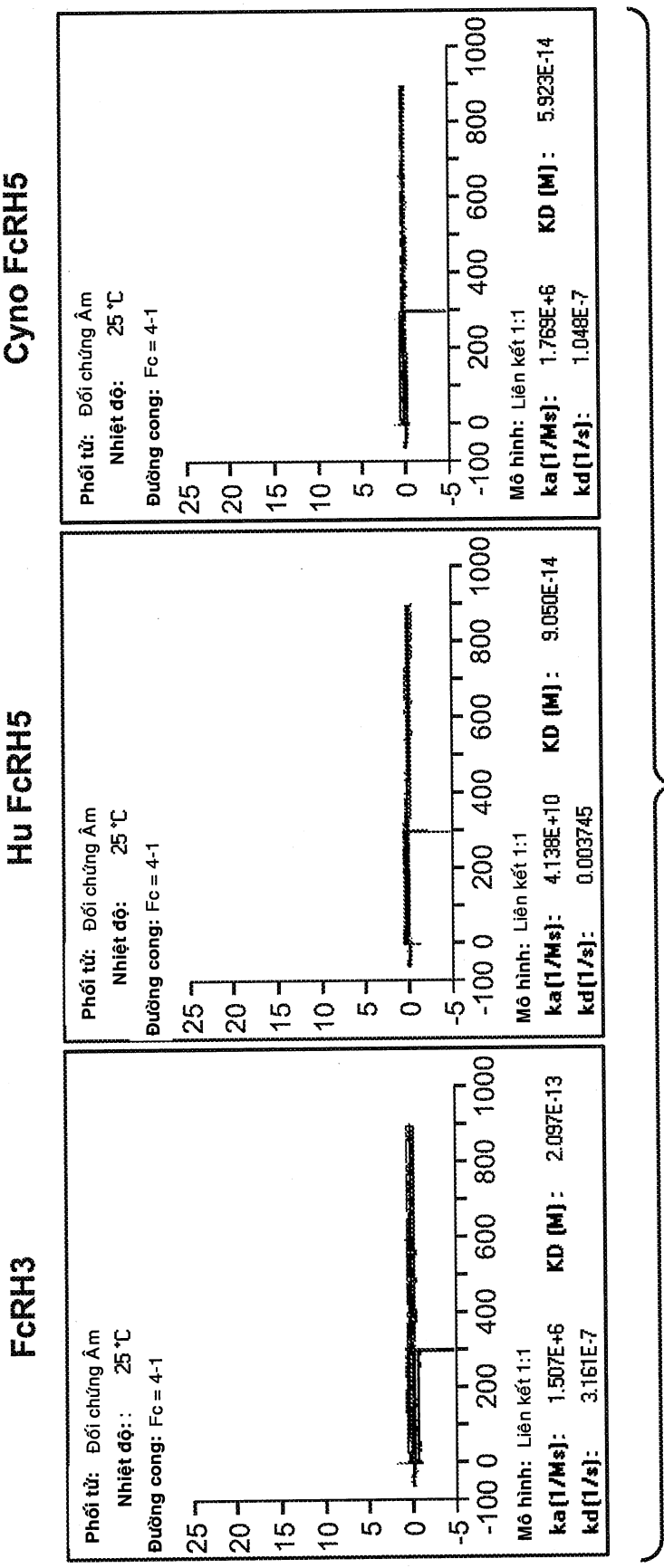
HÌNH 10A


FcRH3
Hu FcRH5
Cyno FcRH5
Phối tử: v85 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 2-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka [1/Ms]: 8.018E+4
KD [M]: 9.244E-8
kd [1/s]: 0.007412
Phối tử: v85 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 2-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka [1/Ms]: 4.413E+5
KD [M]: 2.349E-9
kd [1/s]: 0.001036
Phối tử: v85 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 2-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka [1/Ms]: 1.253E+5
KD [M]: 6.762E-9
kd [1/s]: 8.472E-4

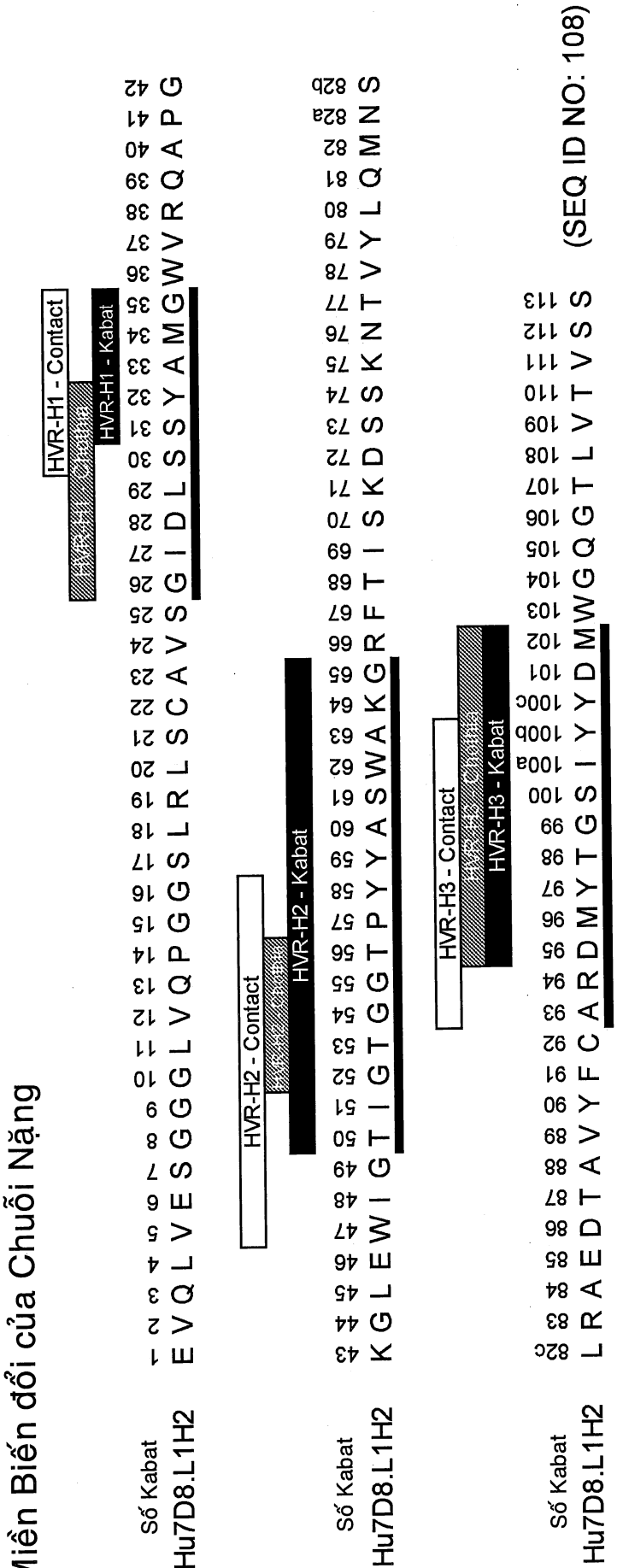
HÌNH 10B


FcRH3
Hu FcRH5
Cyno FcRH5
Phối tử: 1G7 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 4-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka [1/Ms]: 8.198E+4
KD [M]: 3.029E-7
kd [1/s]: 0.02483
Phối tử: 1G7 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 4-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka [1/Ms]: 3.205E+5
KD [M]: 8.819E-9
kd [1/s]: 0.002826
Phối tử: 1G7 TDB
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 4-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka [1/Ms]: 8.902E+4
KD [M]: 2.613E-8
kd [1/s]: 0.002326

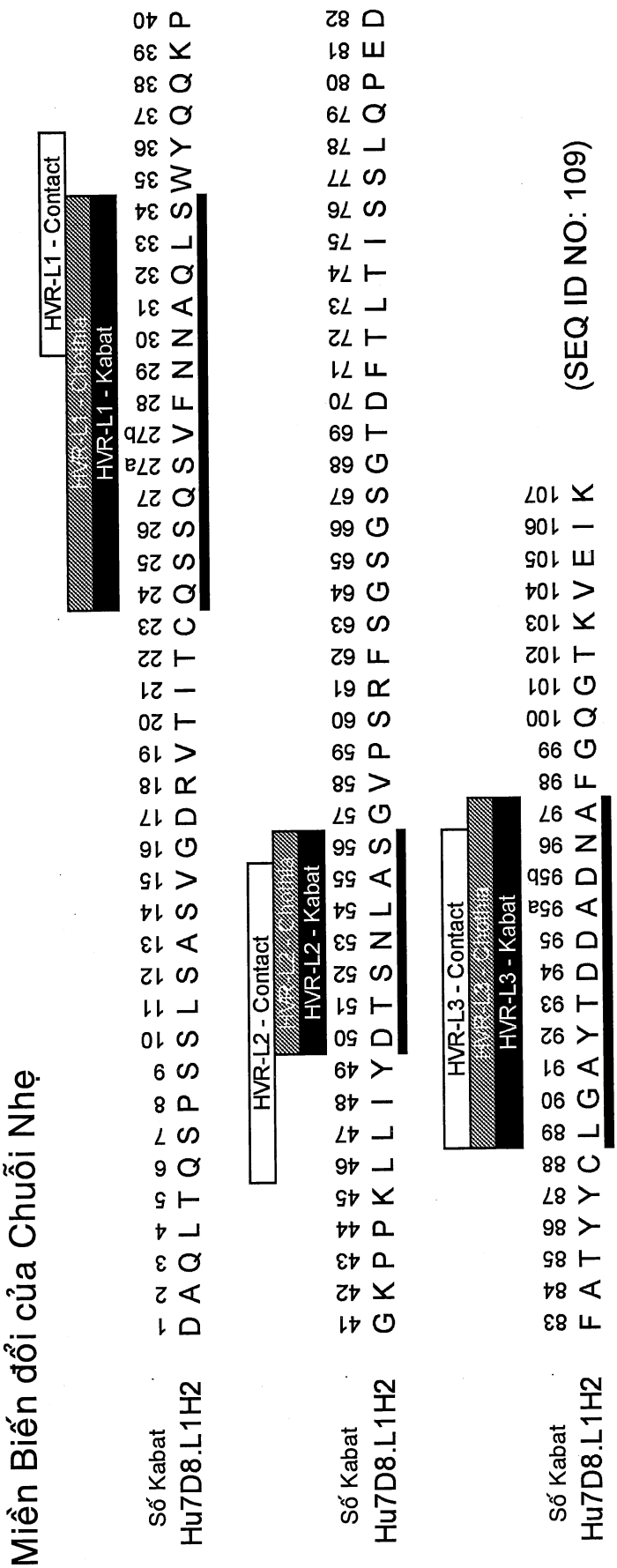
HÌNH 10C


FcRH3
Hu FcRH5
Cyno FcRH5
Phối tử: Đối chứng Âm
Nhiệt độ: : 25 °C
Đường cong: Fc = 4-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka[1/Ms]: 1.507E+6
KD [M]: 2.097E-13
kd[1/s]: 3.161E-7
Phối tử: Đối chứng Âm
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 4-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka[1/Ms]: 4.138E+10
KD [M]: 9.050E-14
kd[1/s]: 0.003745
Phối tử: Đối chứng Âm
Nhiệt độ: 25 °C
Đường cong: Fc = 4-1
Mô hình: Liên kết 1:1
ka[1/Ms]: 1.769E+6
KD [M]: 5.923E-14
kd[1/s]: 1.048E-7

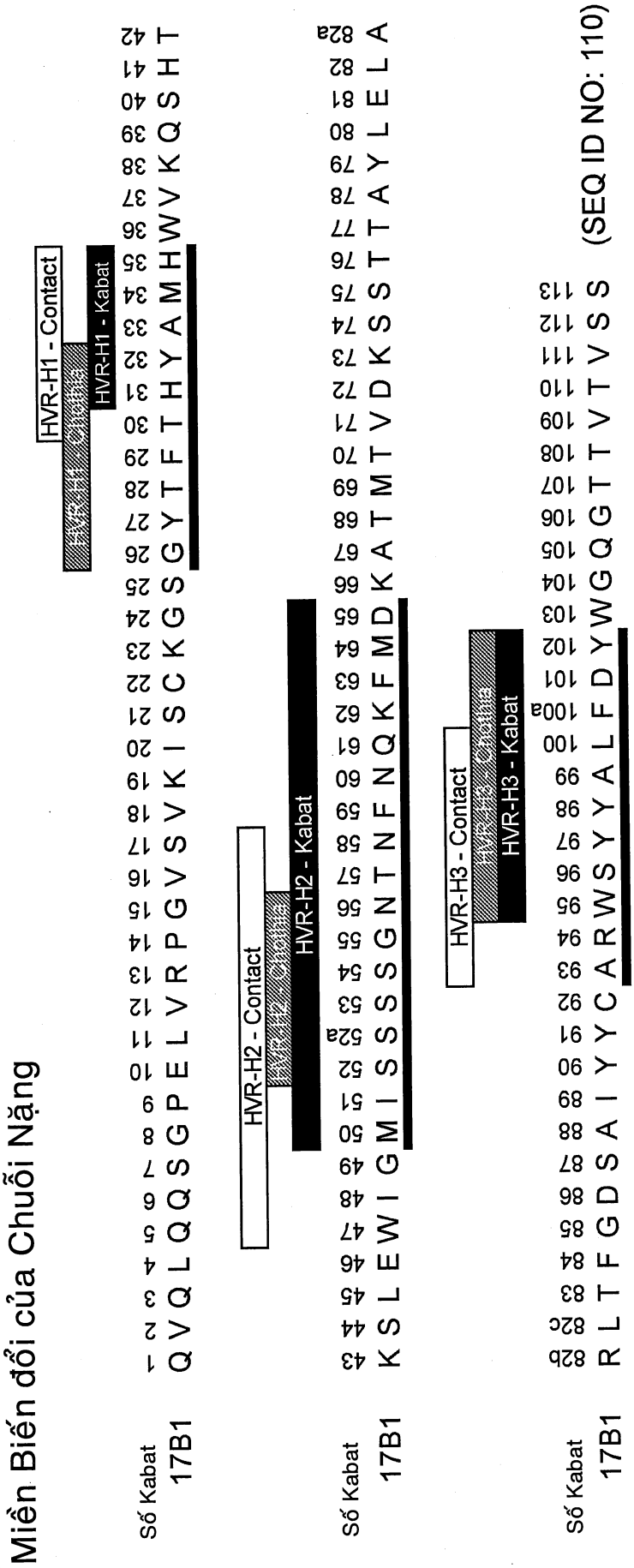
HÌNH 10D


Miền Biến đổi của Chuỗi Nặng
Số Kabat
Hu7D8.L1H2
1 E V Q L V E S G G G L V Q P G G S L R L S C A V S G I D L S S Y A M G W V R Q A P G
42
HVR-H1 - Contact
HVR-H1 - Kabat
43 K G L E W I G T I G T G G T P Y Y A S W A K G R F T I S K D S S K N T V Y L Q M N S
82b
HVR-H2 - Contact
HVR-H2 - Kabat
82c L R A E D T A V Y Y C A R D M Y T G S I Y Y D M W G Q G T L V T V S S (SEQ ID NO: 108)
113
HVR-H3 - Contact
HVR-H3 - Kabat

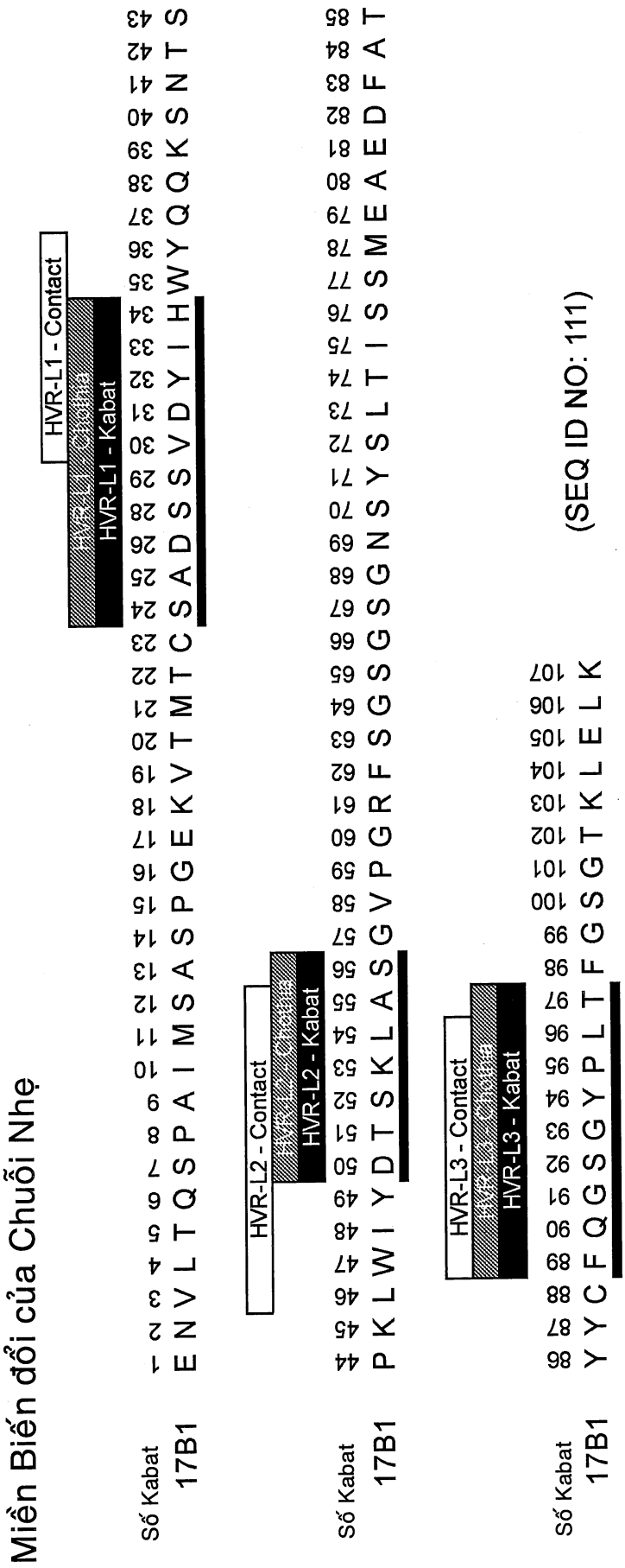
HÌNH 11A


Miền Biến đổi của Chuỗi Nhẹ
HVR-L1 - Contact
HVR-L1 - Chothia
HVR-L1 - Kabat
HVR-L2 - Contact
HVR-L2 - Chothia
HVR-L2 - Kabat
HVR-L3 - Contact
HVR-L3 - Chothia
HVR-L3 - Kabat
Số Kabat
Hu7D8.L1H2
D A Q L T Q S P S S L S A S V G D R V T I T C Q S S Q S V F N N A Q L S W Y Q Q K P
G K P P K L L I Y D T S N L A S G V P S R F S G S G S G T D F T L T I S S L Q P E D
F A T Y Y C L G A Y T D D A D N A F G Q G T K V E I K
(SEQ ID NO: 109)

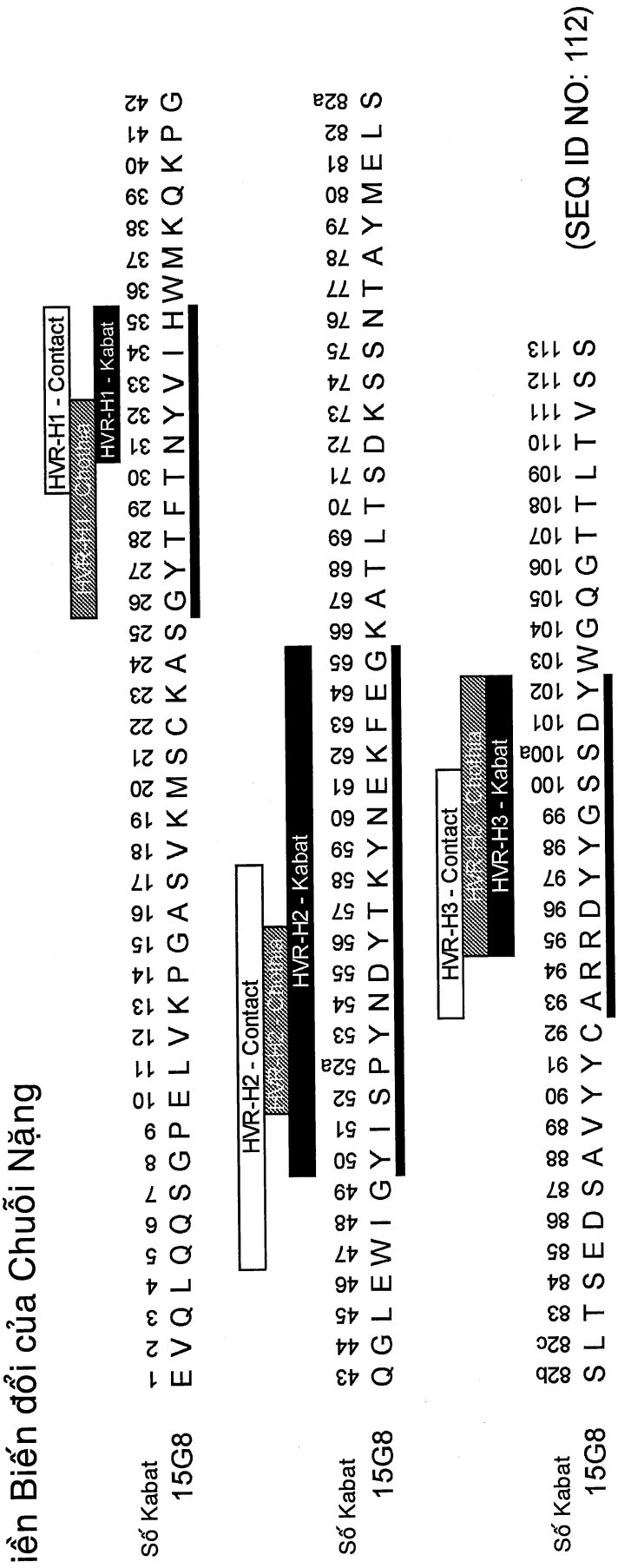
HÌNH 11B


Miền Biến đổi của Chuỗi Nặng
Số Kabat
17B1
HVR-H1 - Contact
HVR-H1 - Kabat
HVR-H2 - Contact
HVR-H2 - Kabat
HVR-H3 - Contact
HVR-H3 - Kabat
(SEQ ID NO: 110)

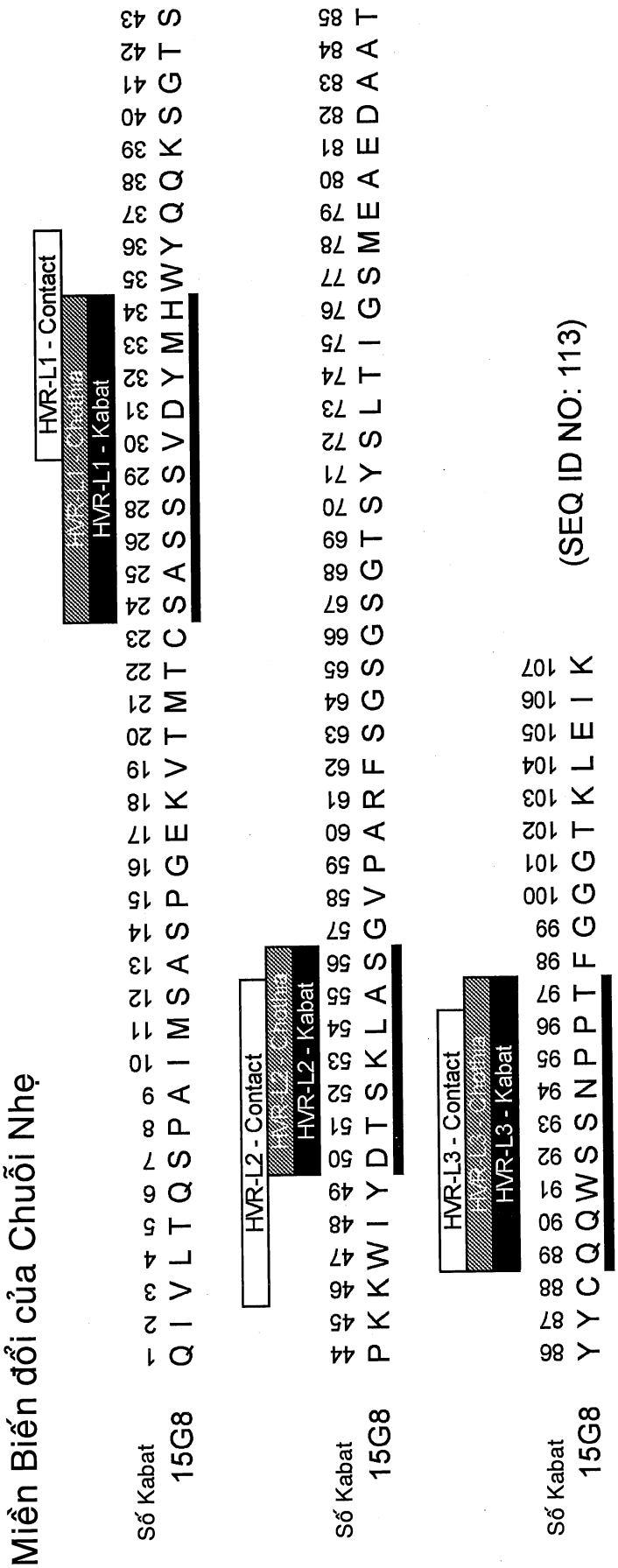
HÌNH 12A


Miền Biến đổi của Chuỗi Nhẹ
Số Kabat
17B1
HVR-L1 - Contact
HVR-L1 - Chothia
HVR-L1 - Kabat
HVR-L2 - Contact
HVR-L2 - Chothia
HVR-L2 - Kabat
HVR-L3 - Contact
HVR-L3 - Chothia
HVR-L3 - Kabat
(SEQ ID NO: 111)

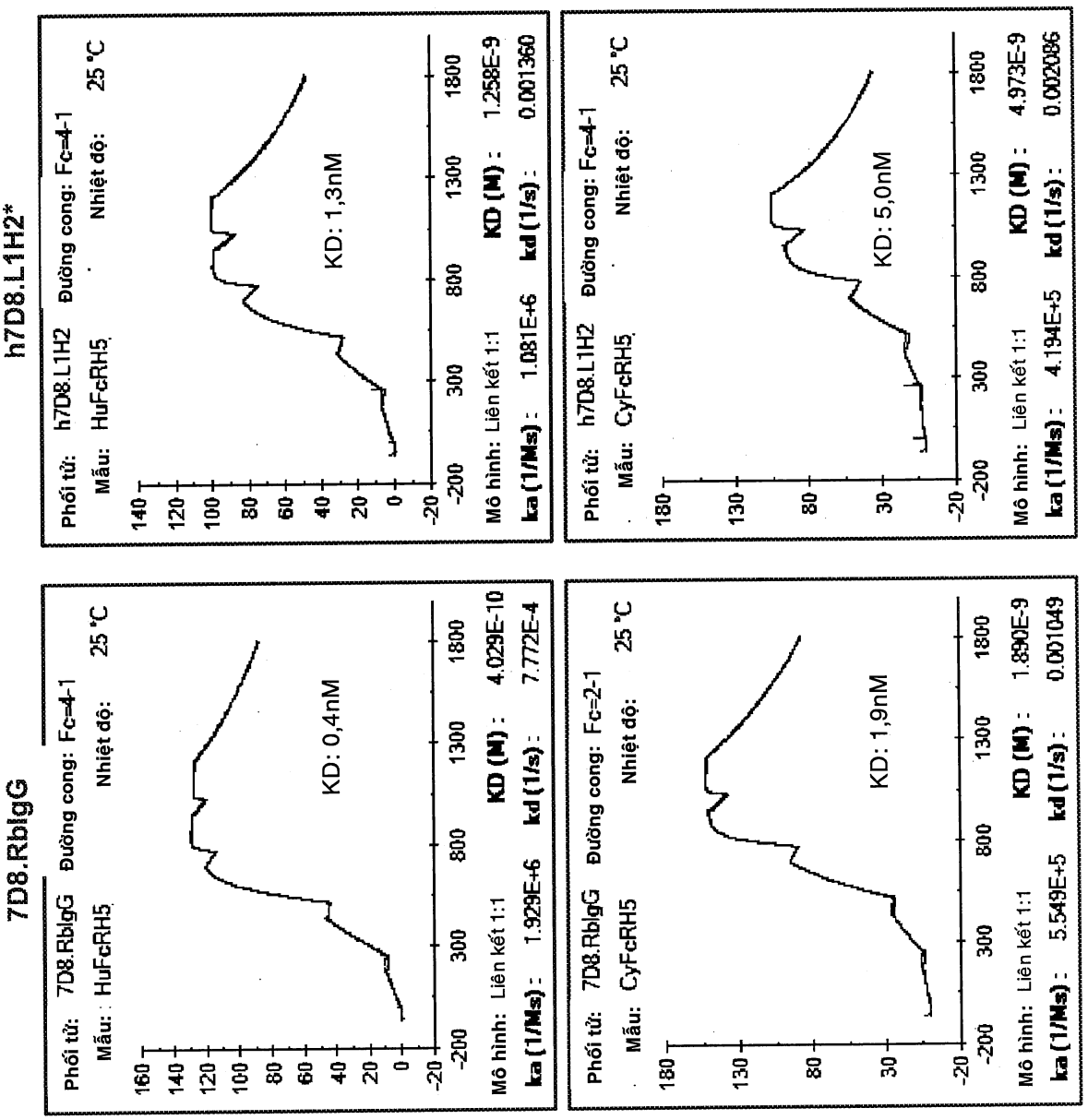
HÌNH 12B


Miền Biến đổi của Chuỗi Nặng
Số Kabat
15G8
HVR-H1 - Contact
HVR-H1 - Kabat
HVR-H2 - Contact
HVR-H2 - Kabat
HVR-H3 - Contact
HVR-H3 - Kabat
(SEQ ID NO: 112)

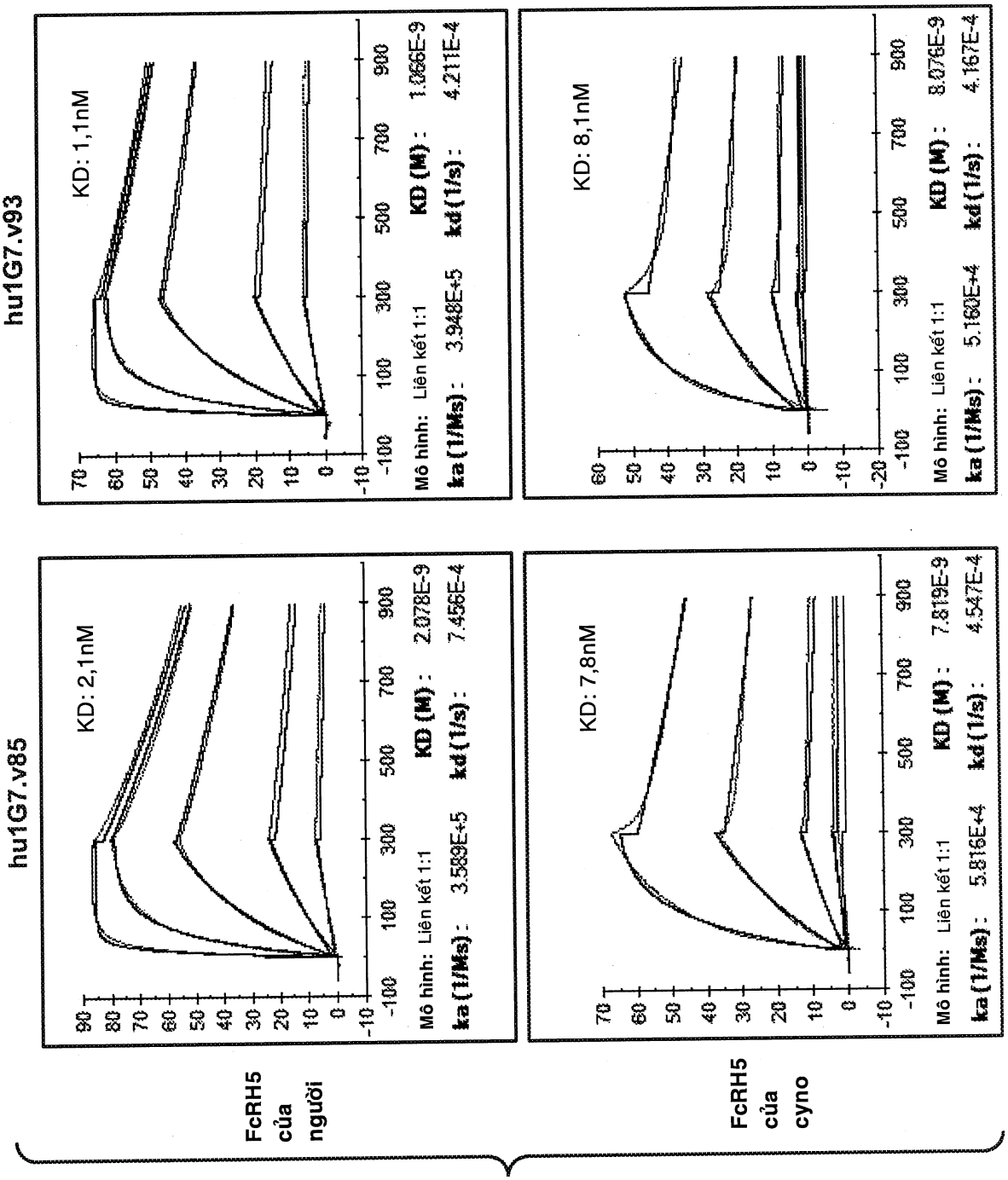
HÌNH 13A


Miền Biến đổi của Chuỗi Nhẹ
Số Kabat
15G8
Q I V L T Q S P A I M S A S P G E K V T M T C S A S S S V D Y M H W Y Q Q K S G T S
1 2 3 4 5 6 7 8 9 10 11 12 13 14 15 16 17 18 19 20 21 22 23 24 25 26 27 28 29 30 31 32 33 34 35 36 37 38 39 40 41 42 43
HVR-L1 - Contact
HVR-L1 - Chothia
HVR-L1 - Kabat
P K K W I Y D T S K L A S G V P A R F S G S G S G T S Y S L T I G S M E A E D A A T
44 45 46 47 48 49 50 51 52 53 54 55 56 57 58 59 60 61 62 63 64 65 66 67 68 69 70 71 72 73 74 75 76 77 78 79 80 81 82 83 84 85
HVR-L2 - Contact
HVR-L2 - Chothia
HVR-L2 - Kabat
Y Y C Q Q W S S N P P T F G G G T K L E I K
86 87 88 89 90 91 92 93 94 95 96 97 98 99 100 101 102 103 104 105 106 107
HVR-L3 - Contact
HVR-L3 - Chothia
HVR-L3 - Kabat
(SEQ ID NO: 113)

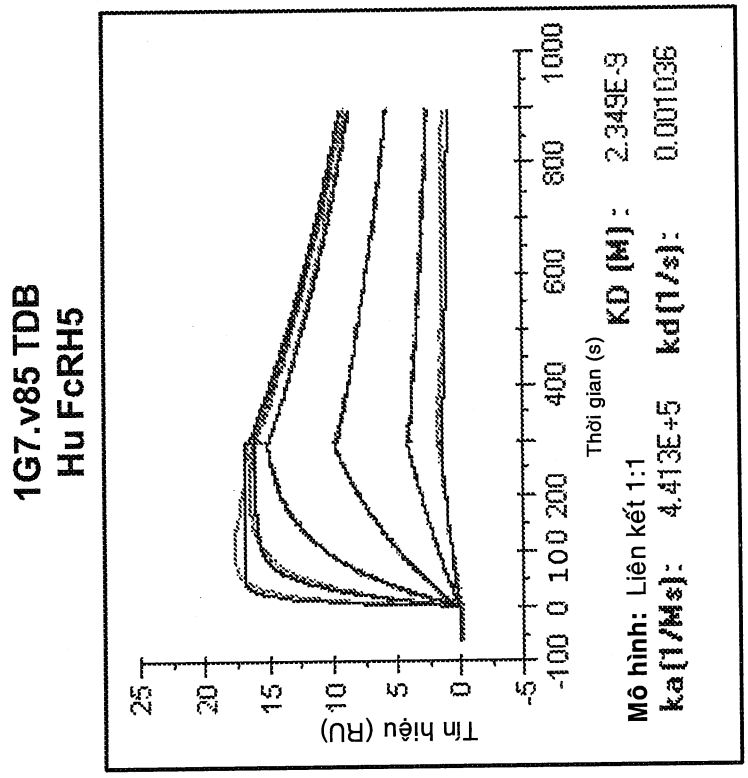
HÌNH 13B


7D8.RbIgG
h7D8.L1H2*
FcRH5 của người
FcRH5 của cyno
Phối tử: 7D8.RbIgG Đường cong: Fc=4-1
Mẫu: HuFcRH5 Nhiệt độ: 25 °C
KD: 0,4nM
Mô hình: Liên kết 1:1 KD (M): 4.029E-10
ka (1/Ms): 1.929E+6 kd (1/s): 7.772E-4
Phối tử: h7D8.L1H2 Đường cong: Fc=4-1
Mẫu: HuFcRH5 Nhiệt độ: 25 °C
KD: 1,3nM
Mô hình: Liên kết 1:1 KD (M): 1.258E-9
ka (1/Ms): 1.081E+6 kd (1/s): 0.001360
Phối tử: 7D8.RbIgG Đường cong: Fc=2-1
Mẫu: CyFcRH5 Nhiệt độ: 25 °C
KD: 1,9nM
Mô hình: Liên kết 1:1 KD (M): 1.890E-9
ka (1/Ms): 5.549E+5 kd (1/s): 0.001049
Phối tử: h7D8.L1H2 Đường cong: Fc=4-1
Mẫu: CyFcRH5 Nhiệt độ: 25 °C
KD: 5,0nM
Mô hình: Liên kết 1:1 KD (M): 4.973E-9
ka (1/Ms): 4.194E+5 kd (1/s): 0.002086

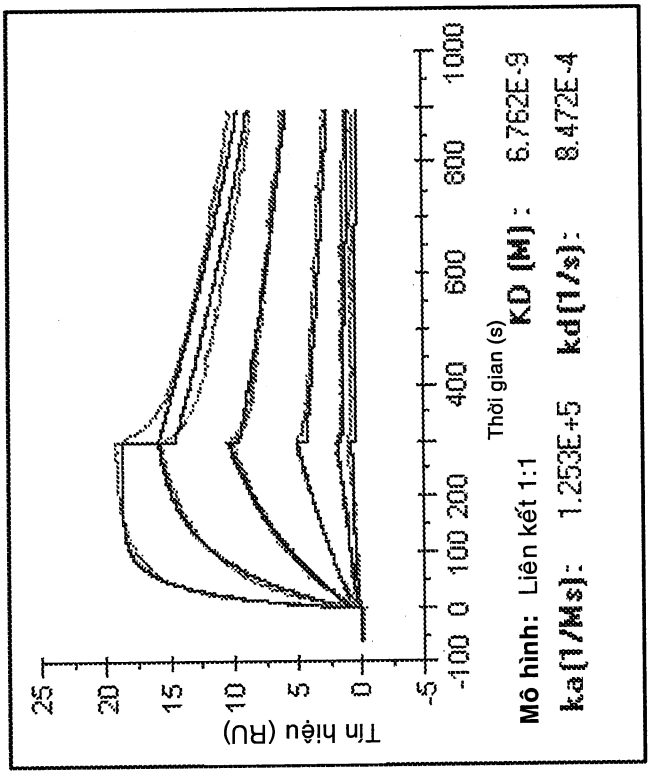
HÌNH 14


hu1G7.v85
hu1G7.v93
KD: 2,1nM
KD: 1,1nM
KD: 7,8nM
KD: 8,1nM
FcRH5 của người
FcRH5 của cyno
Mô hình: Liên kết 1:1
KD (M): 2.078E-9
ka (1/Ms): 3.589E+5
kd (1/s): 7.456E-4
Mô hình: Liên kết 1:1
KD (M): 1.066E-9
ka (1/Ms): 3.948E+5
kd (1/s): 4.211E-4
Mô hình: Liên kết 1:1
KD (M): 7.819E-9
ka (1/Ms): 5.816E+4
kd (1/s): 4.547E-4
Mô hình: Liên kết 1:1
KD (M): 8.076E-9
ka (1/Ms): 5.160E+4
kd (1/s): 4.167E-4

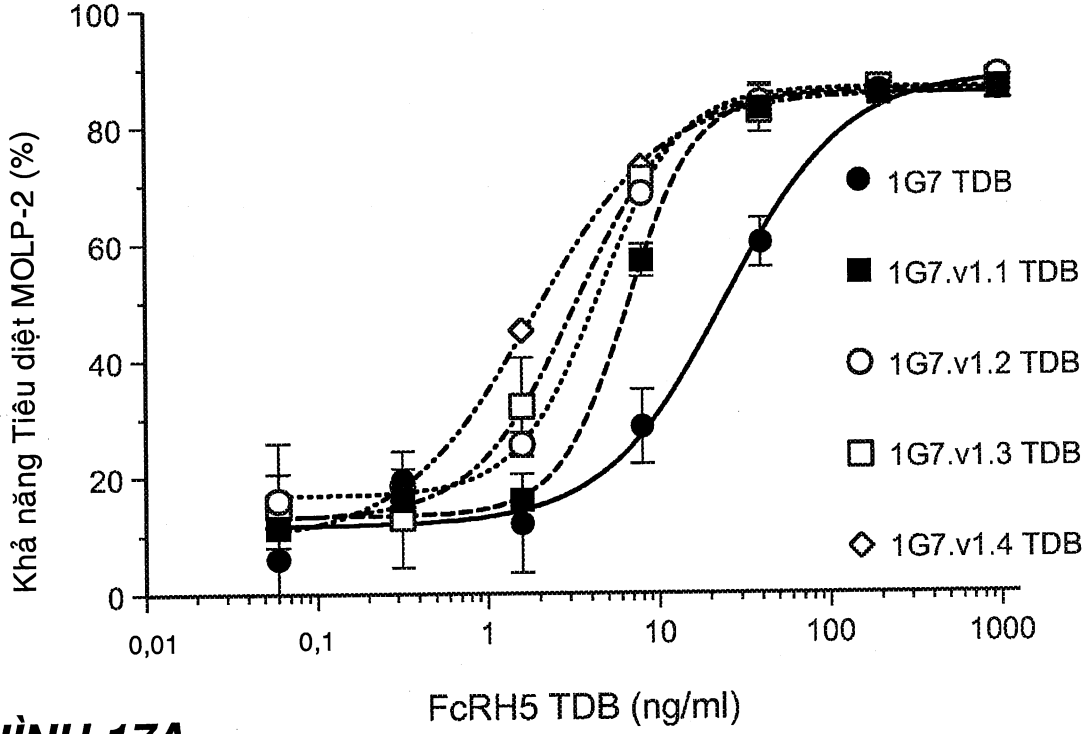
HÌNH 15



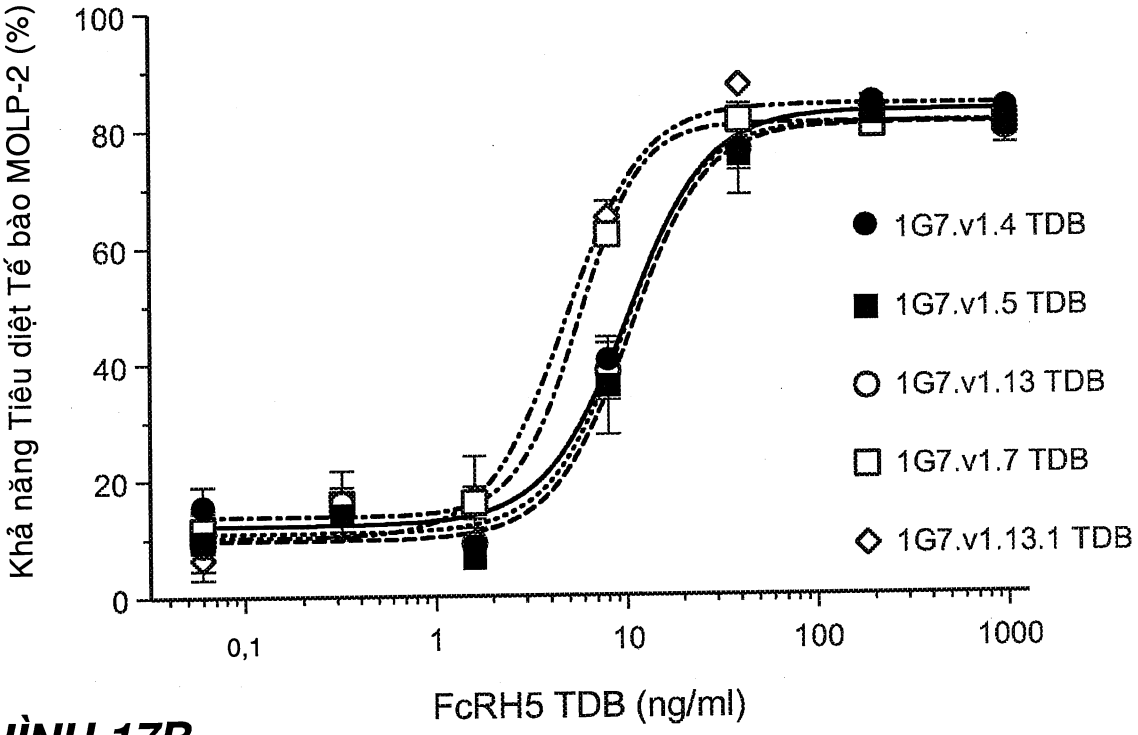
HÌNH 16A



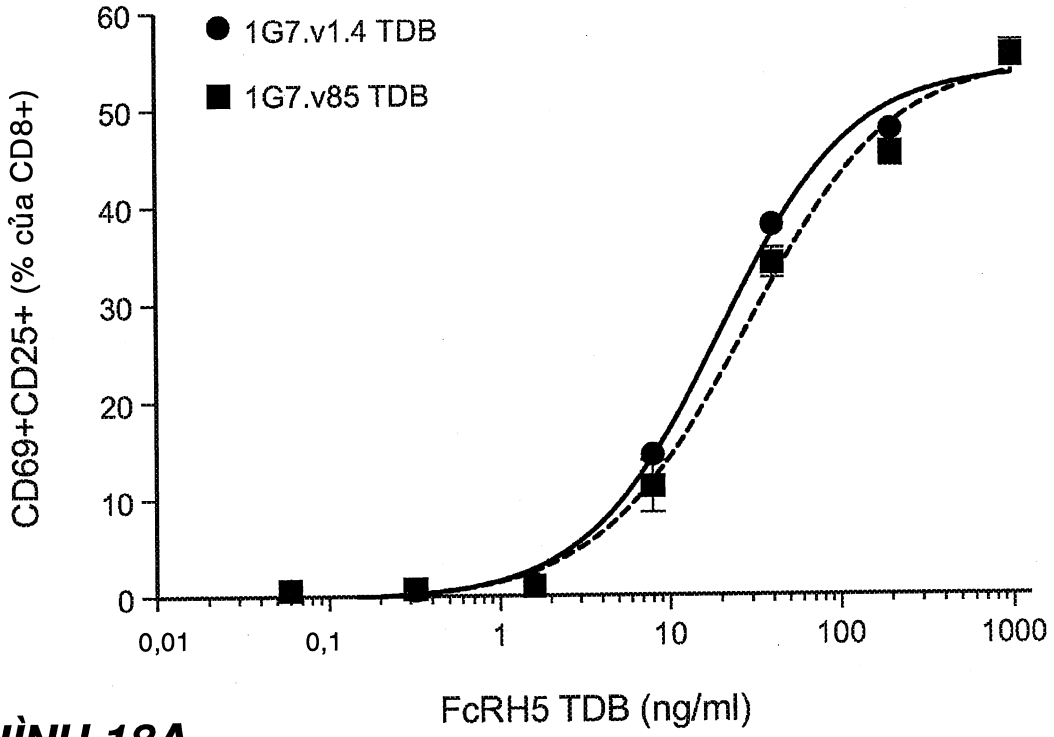
HÌNH 16B



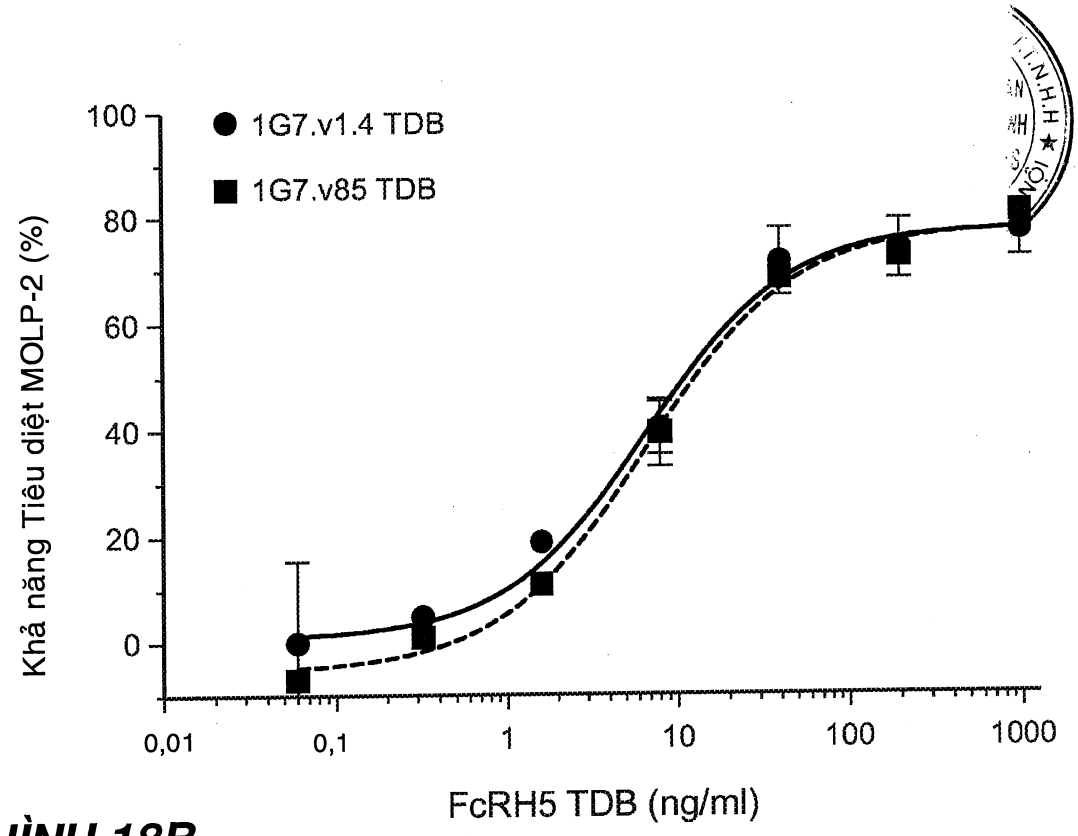
HÌNH 17A



HÌNH 17B



HÌNH 18A



HÌNH 18B

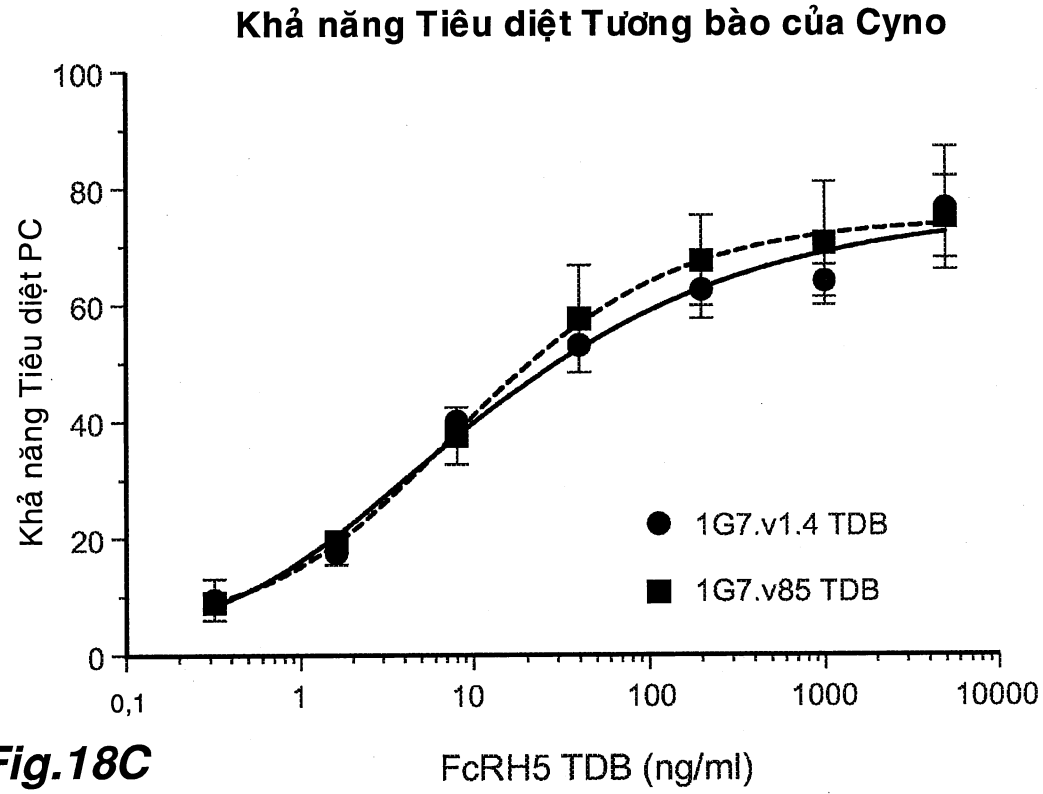


Fig.18C

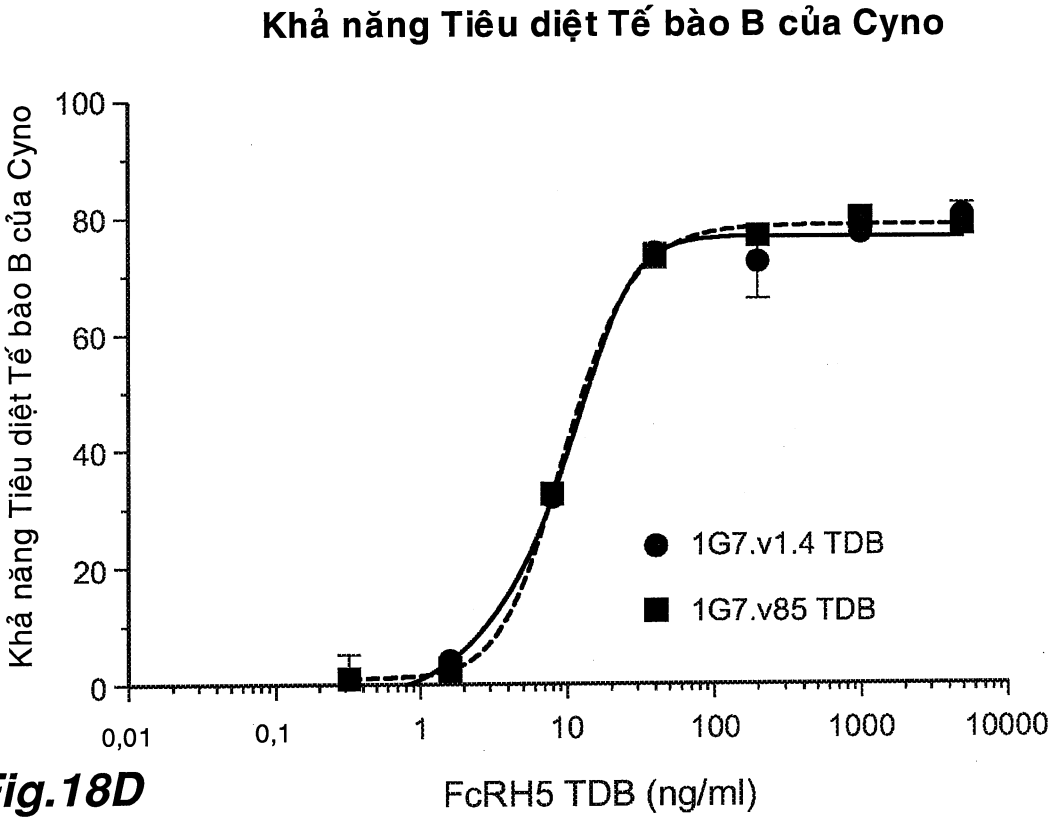


Fig.18D

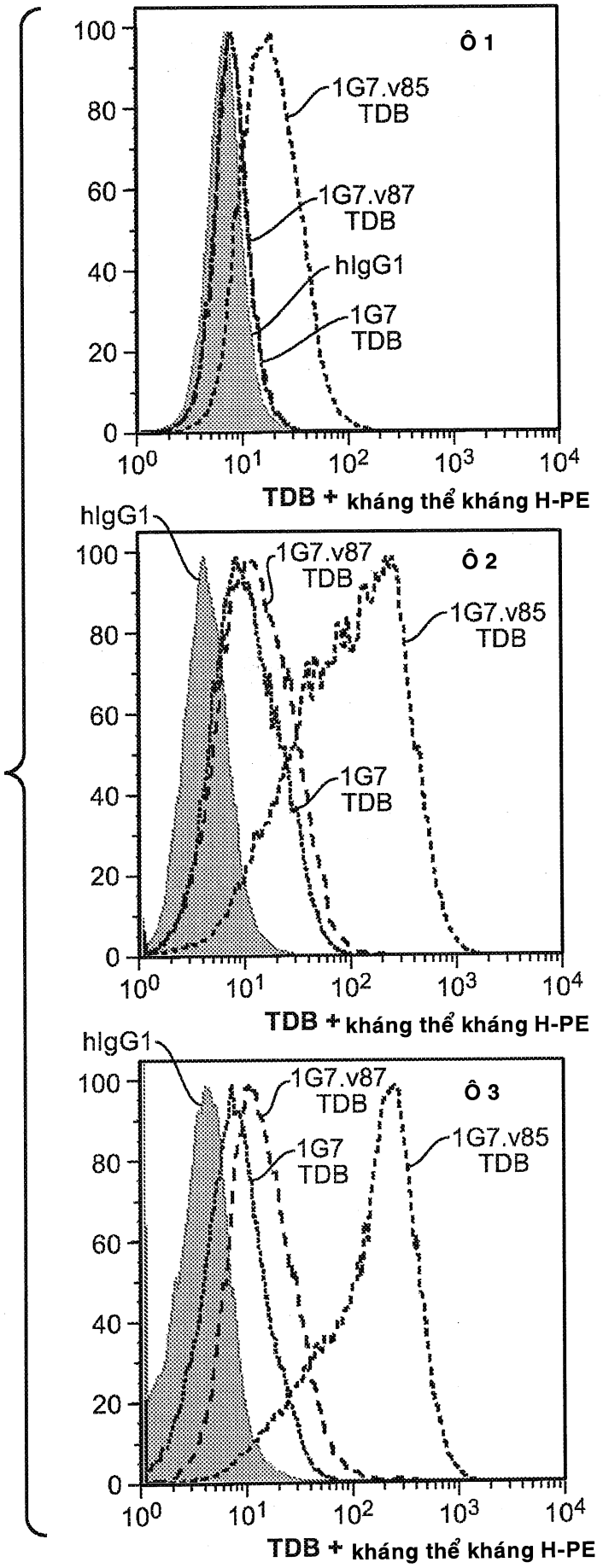

Ô 1
1G7.v85 TDB
1G7.v87 TDB
hIgG1
1G7 TDB
TDB + kháng thể kháng H-PE
Ô 2
Ô 3

Fig.19A

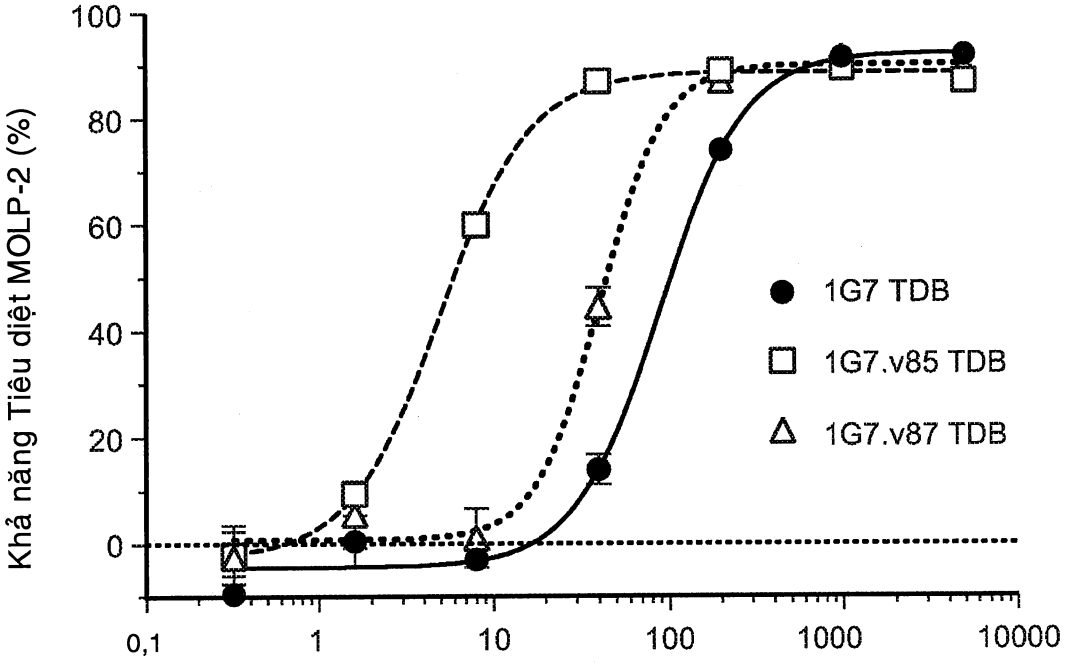


Fig.19B

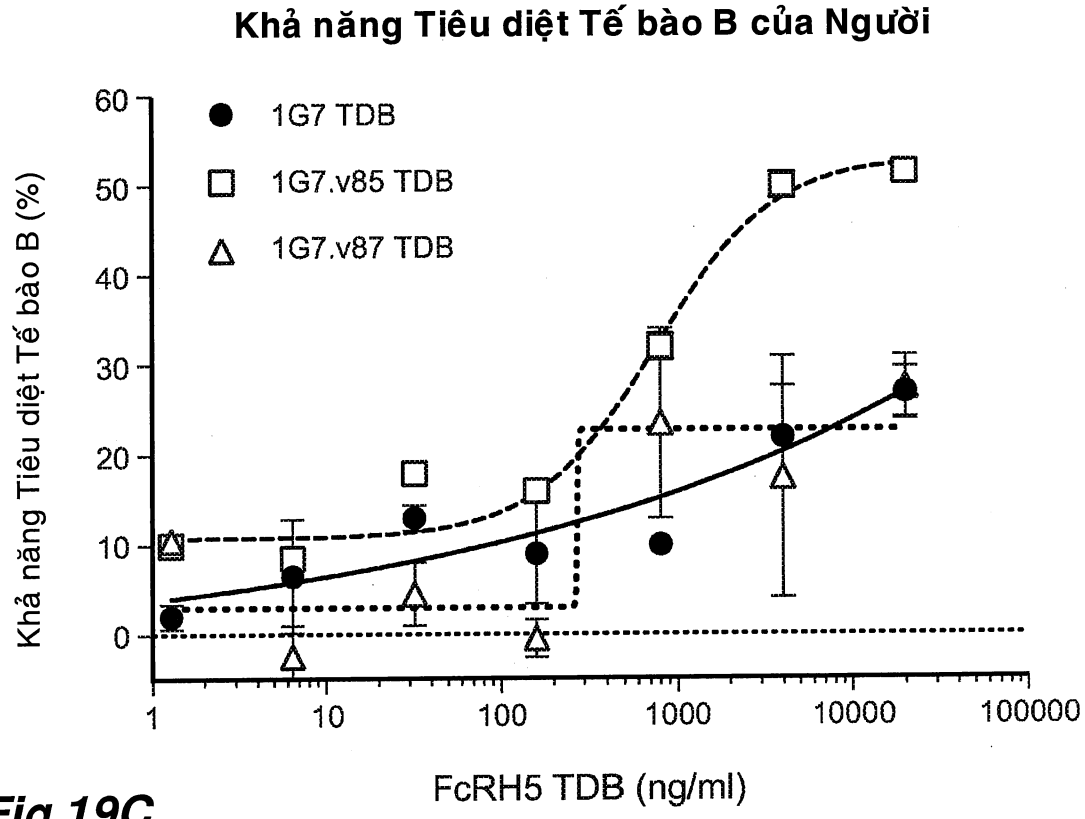


Fig.19C

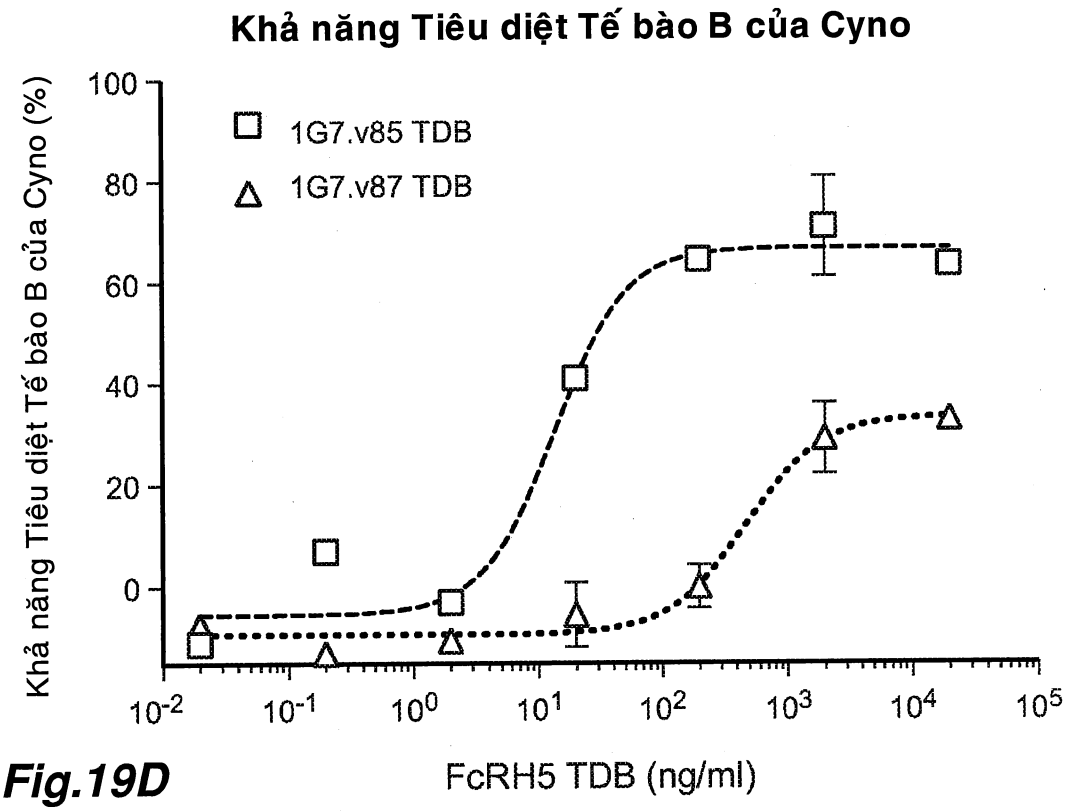

Khả năng Tiêu diệt Tế bào B của Cyno
Khả năng Tiêu diệt Tế bào B của Cyno (%)
100
80
60
40
20
0
1G7.v85 TDB
1G7.v87 TDB
10^{-2}
10^{-1}
10^{0}
10^{1}
10^{2}
10^{3}
10^{4}
10^{5}
FcRH5 TDB (ng/ml)

Fig.19D

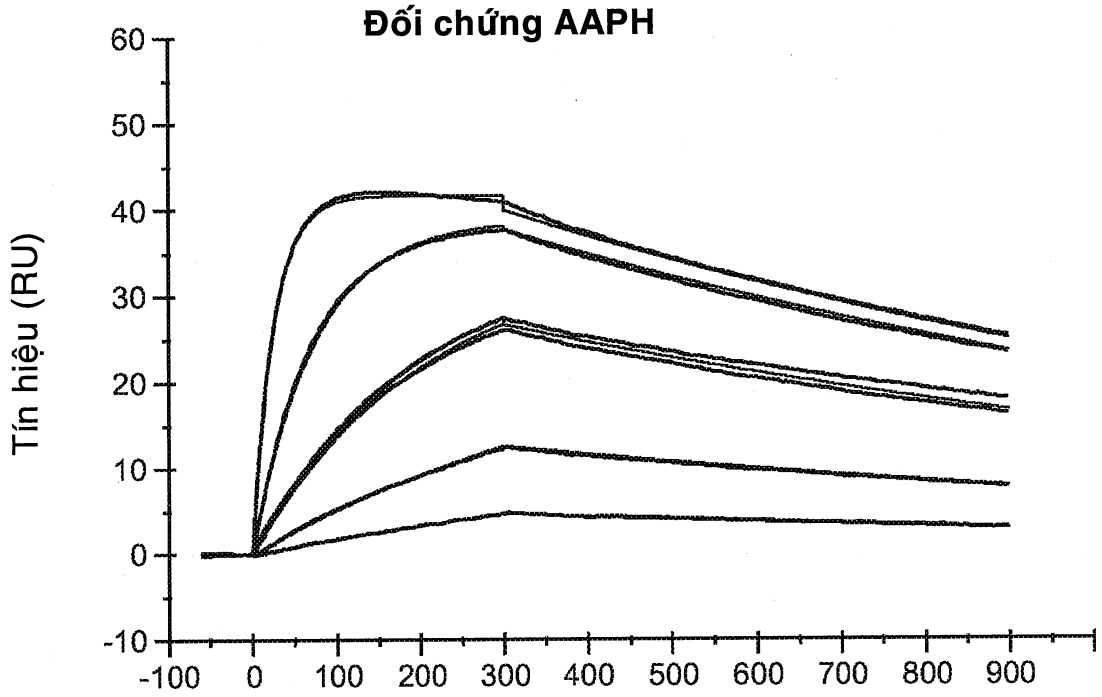


Fig.20A

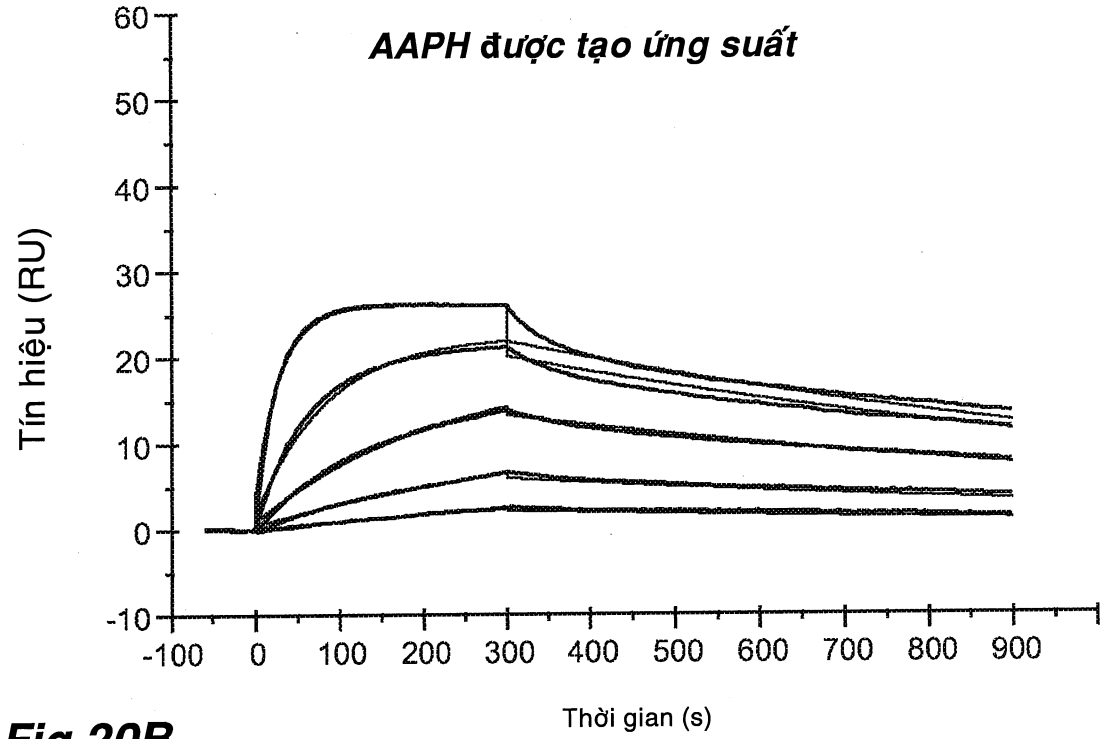


Fig.20B

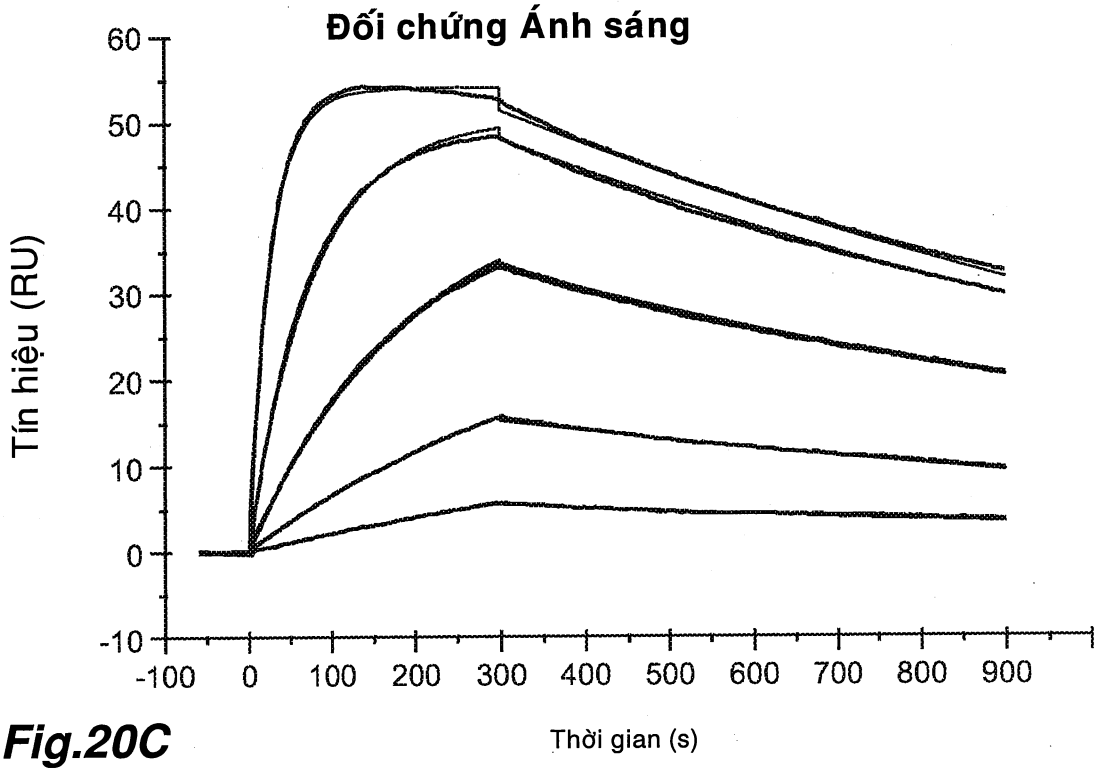


Fig.20C

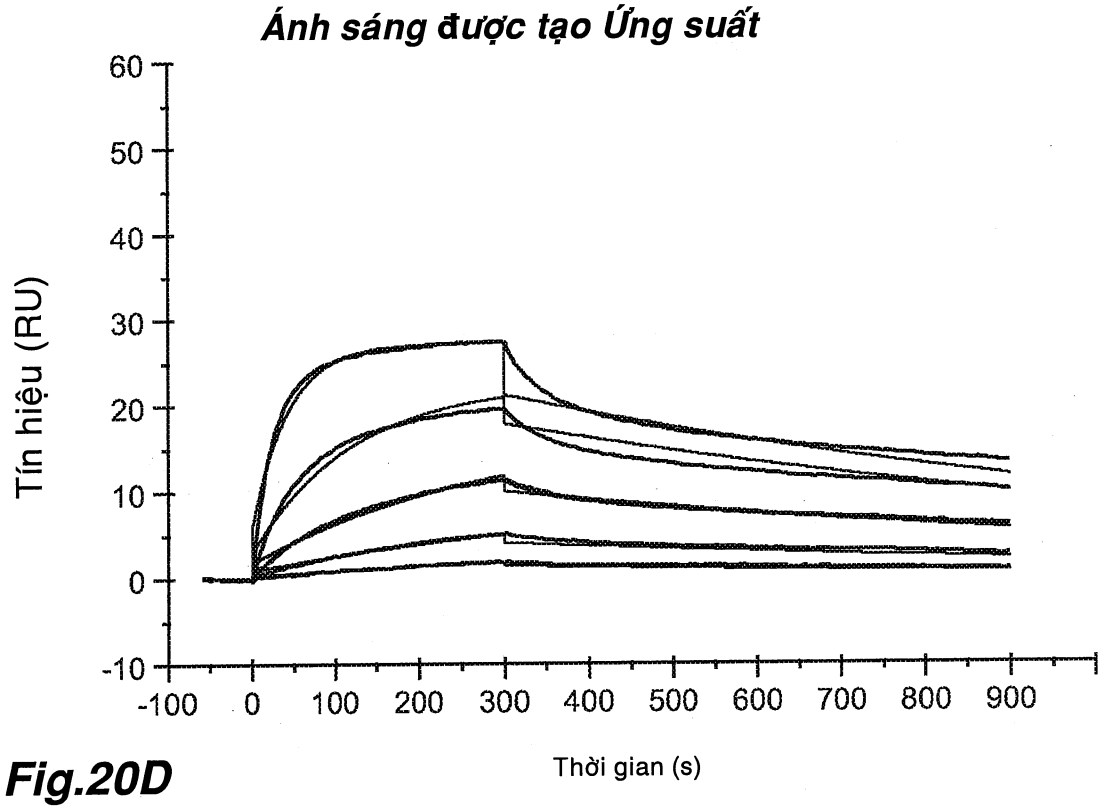


Fig.20D

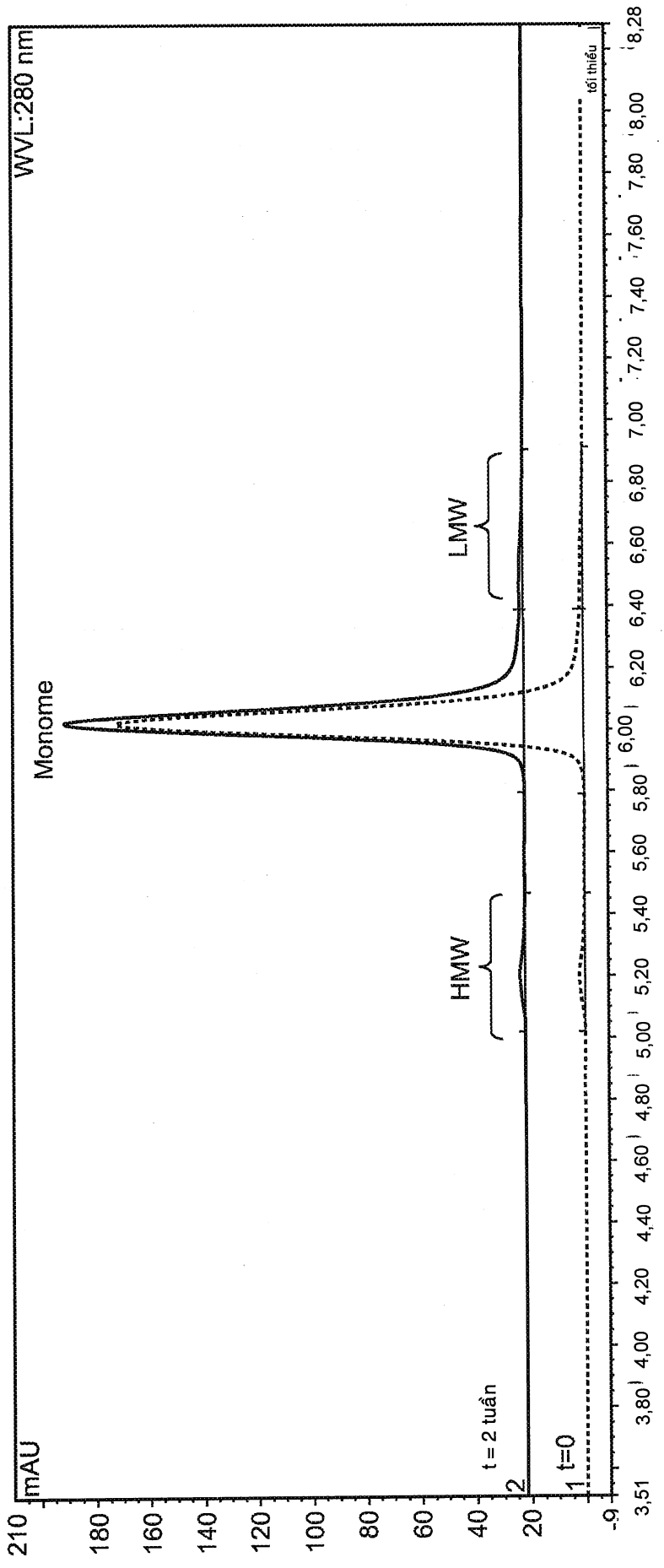

WVL:280 nm
mAU
Monome
HMW
LMW
t = 2 tuần
t=0
tối thiểu
210
180
160
140
120
100
80
60
40
20
-9
3,51
3,80
4,00
4,20
4,40
4,60
4,80
5,00
5,20
5,40
5,60
5,80
6,00
6,20
6,40
6,60
6,80
7,00
7,20
7,40
7,60
7,80
8,00
8,28

Fig.21A

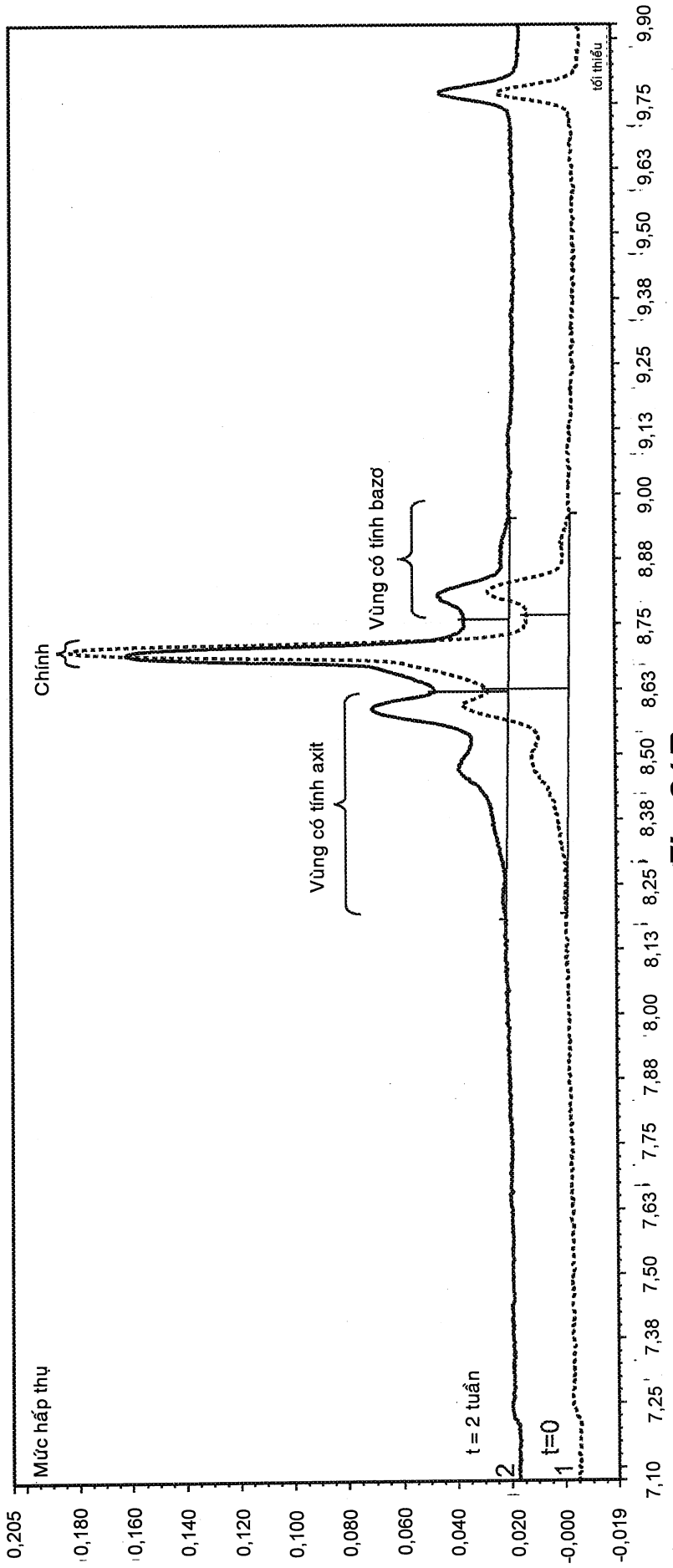

Mức hấp thụ
0,205
0,180
0,160
0,140
0,120
0,100
0,080
0,060
0,040
0,020
-0,000
-0,019
7,10
7,25
7,38
7,50
7,63
7,75
7,88
8,00
8,13
8,25
8,38
8,50
8,63
8,75
8,88
9,00
9,13
9,25
9,38
9,50
9,63
9,75
9,90
tối thiểu
Chính
Vùng có tính bazơ
Vùng có tính axit
t = 2 tuần
t=0
1
2

Fig.21B

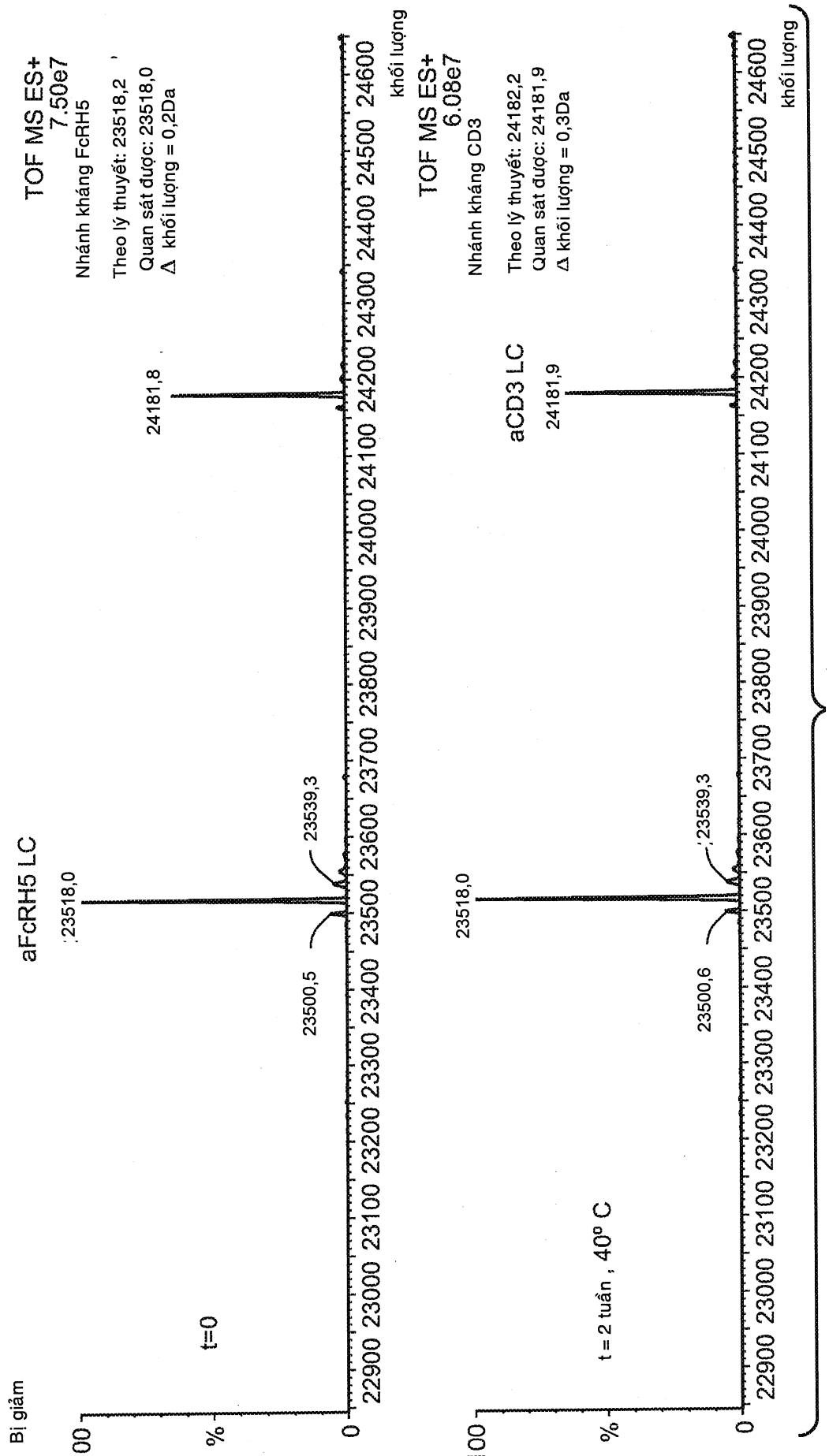

Bị giảm
aFcRH5 LC
TOF MS ES+
7.50e7
Nhánh kháng FcRH5
Theo lý thuyết: 23518,2
Quan sát được: 23518,0
Δ khối lượng = 0,2Da
23518,0
23539,3
23500,5
24181,8
t=0
100
%
0
22900 23000 23100 23200 23300 23400 23500 23600 23700 23800 23900 24000 24100 24200 24300 24400 24500 24600
khối lượng
aCD3 LC
TOF MS ES+
6.08e7
Nhánh kháng CD3
Theo lý thuyết: 24182,2
Quan sát được: 24181,9
Δ khối lượng = 0,3Da
23518,0
23539,3
23500,6
24181,9
t = 2 tuần , 40° C
100
%
0
22900 23000 23100 23200 23300 23400 23500 23600 23700 23800 23900 24000 24100 24200 24300 24400 24500 24600
khối lượng

Fig.22A

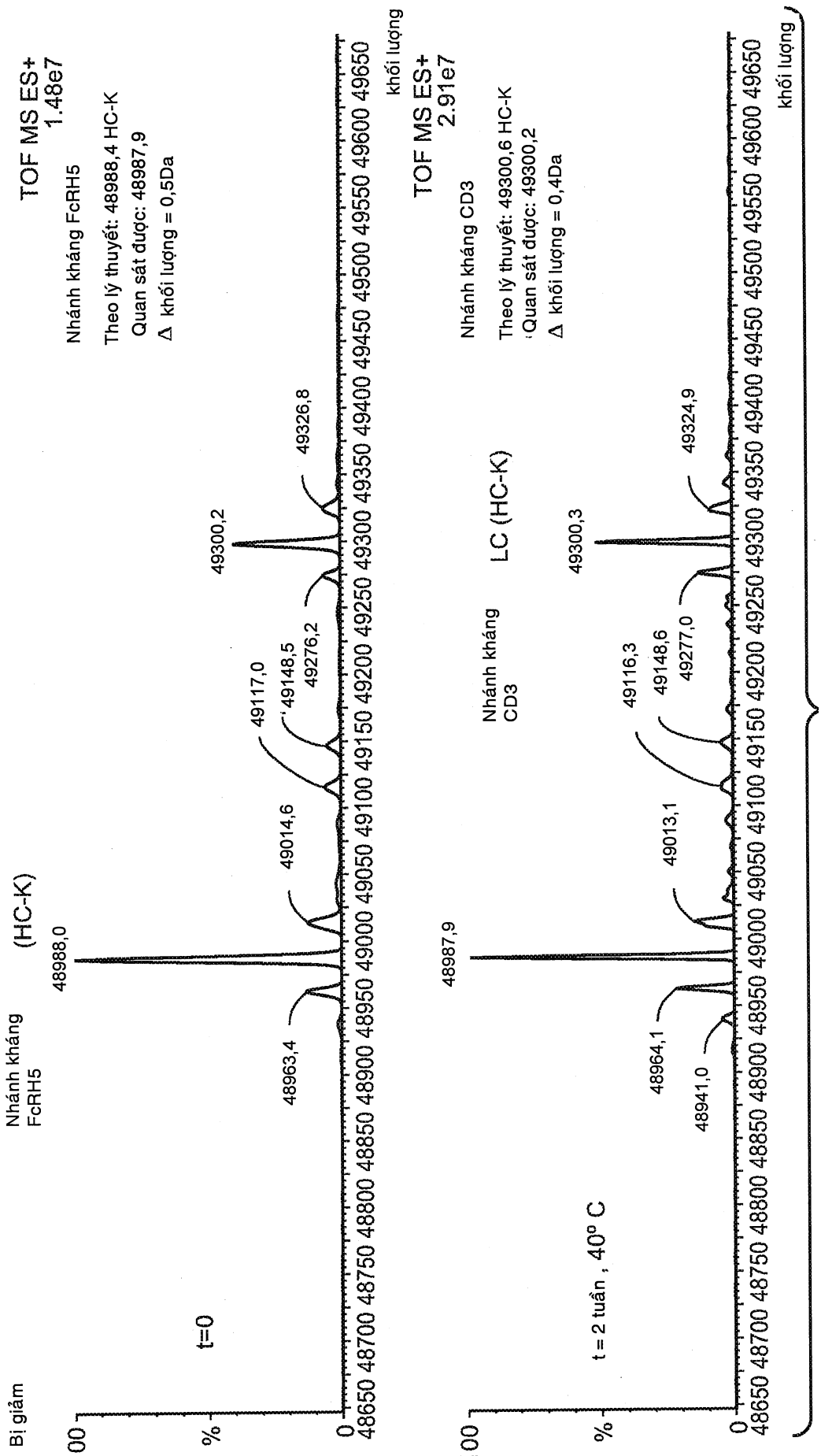

Bị giảm
Nhánh kháng FcRH5 (HC-K)
t=0
TOF MS ES+ 1.48e7
Nhánh kháng FcRH5
Theo lý thuyết: 48988,4 HC-K
Quan sát được: 48987,9
Δ khối lượng = 0,5Da
48988,0
48963,4
49014,6
49117,0
49148,5
49276,2
49300,2
49326,8
khối lượng
Nhánh kháng CD3 LC (HC-K)
t = 2 tuần , 40° C
TOF MS ES+ 2.91e7
Nhánh kháng CD3
Theo lý thuyết: 49300,6 HC-K
Quan sát được: 49300,2
Δ khối lượng = 0,4Da
48987,9
48964,1
48941,0
49013,1
49116,3
49148,6
49277,0
49300,3
49324,9
khối lượng

Fig.22B

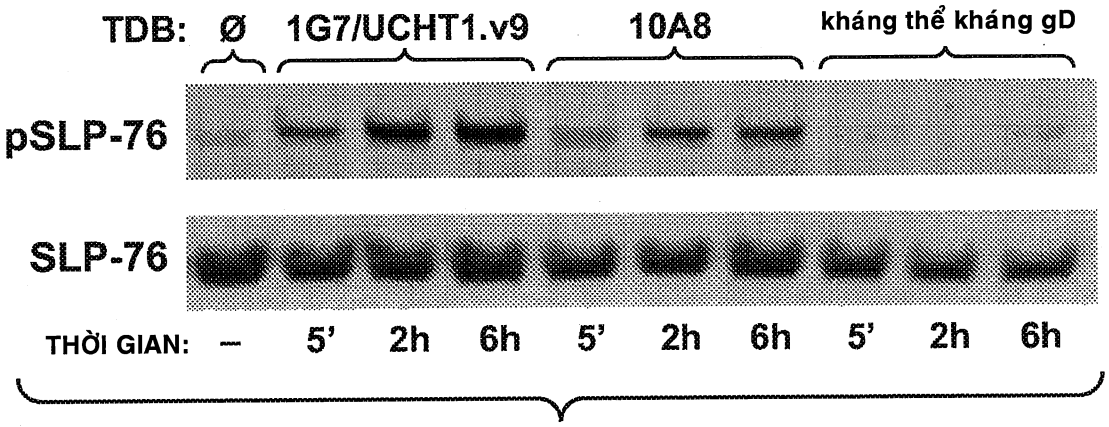


Fig.23A

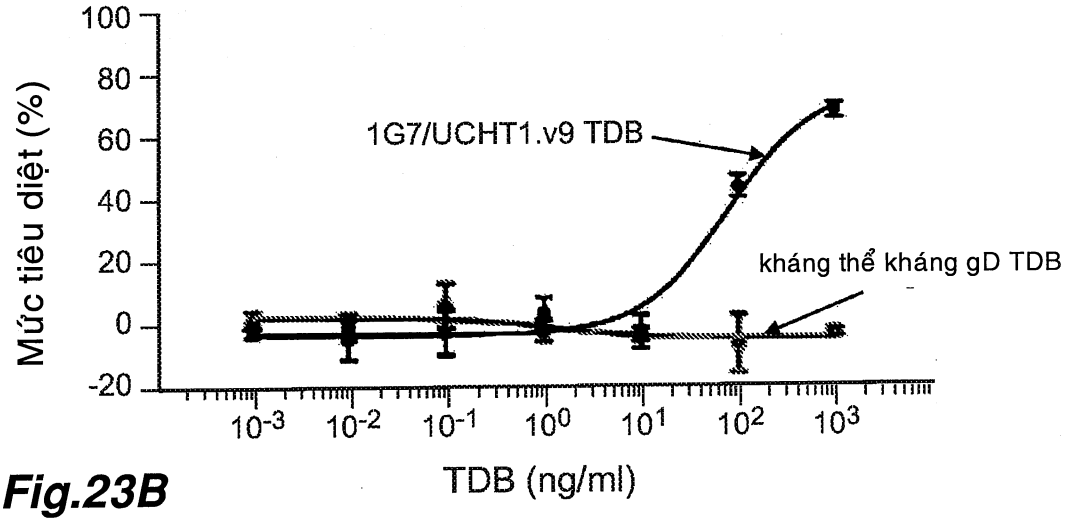


Fig.23B

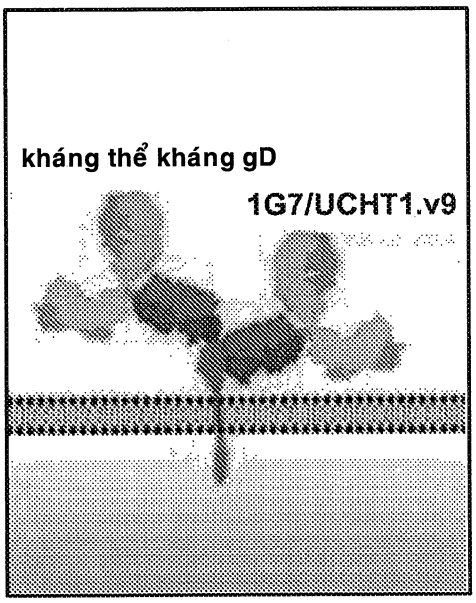


Fig.23C

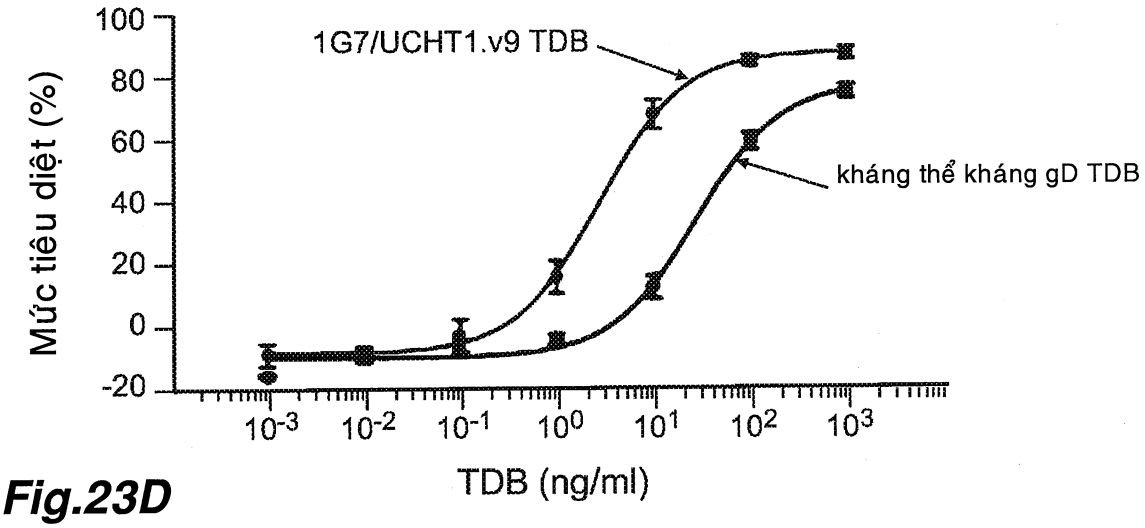


Fig.23D

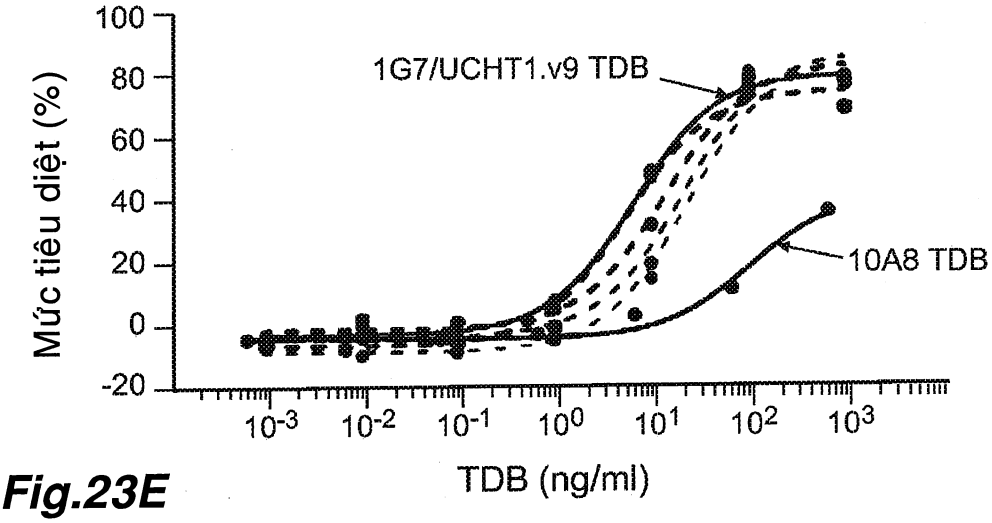


Fig.23E

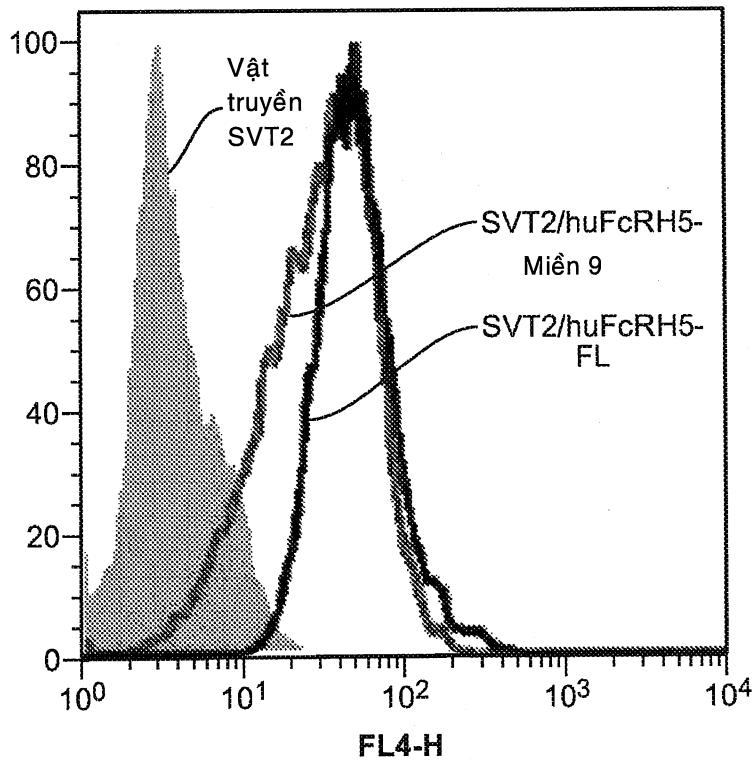


Fig.24A

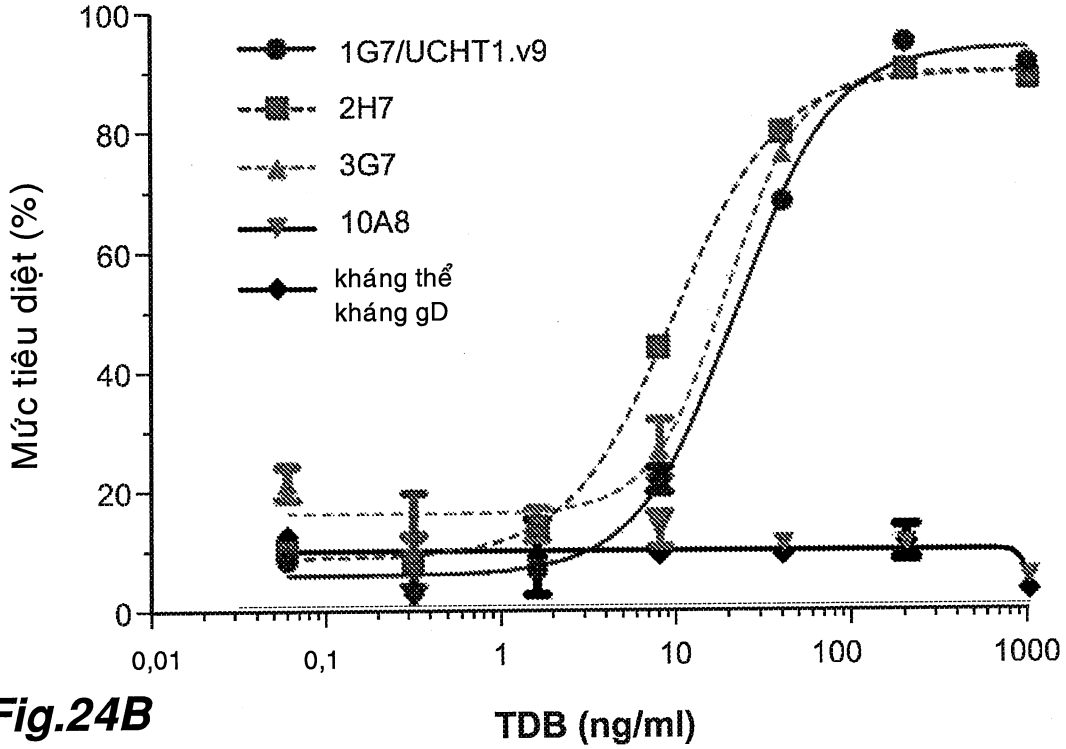


Fig.24B

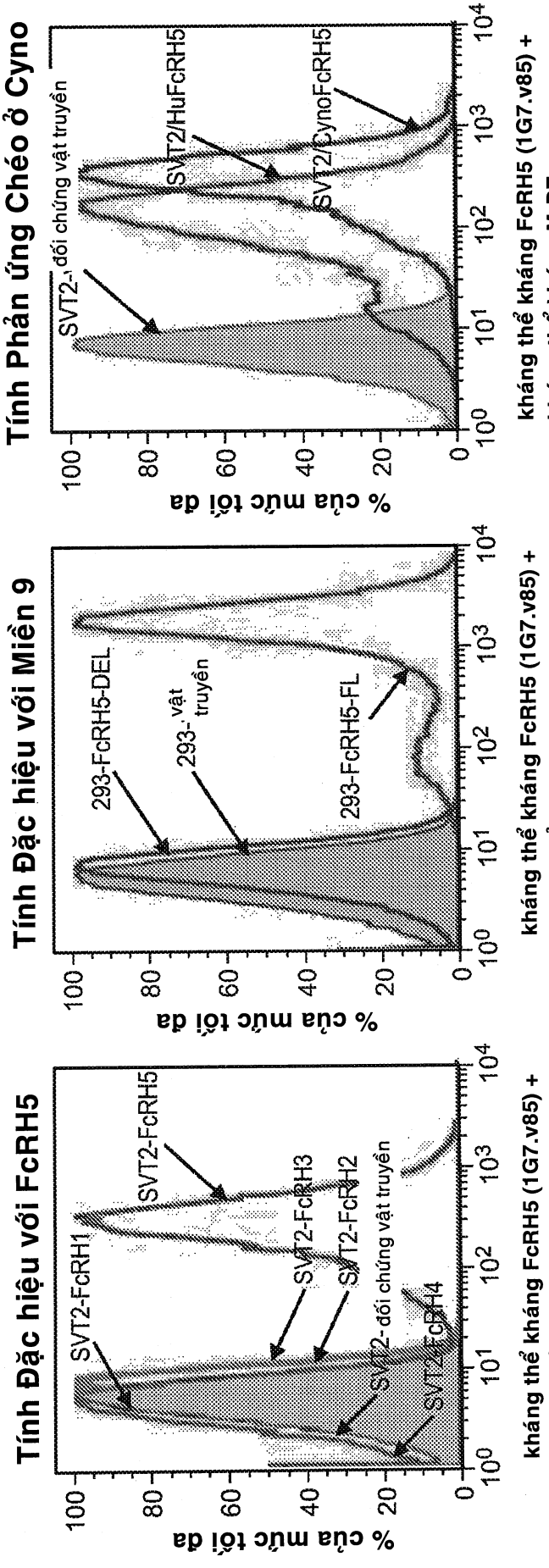


Fig.25A

Fig.25B

Fig.25C

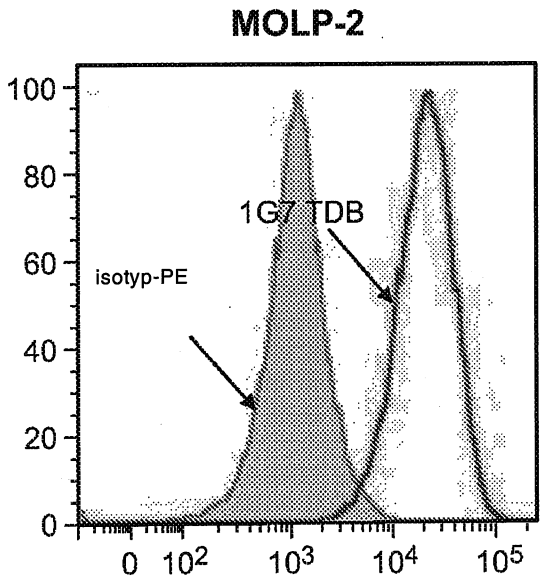


Fig.26A

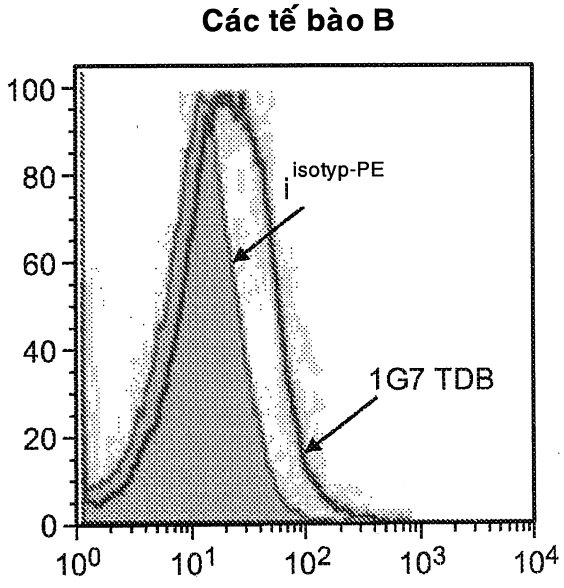


Fig.26B

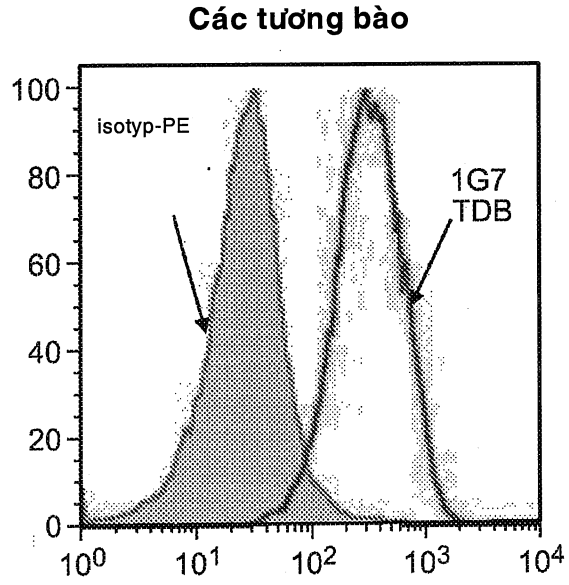


Fig.26C

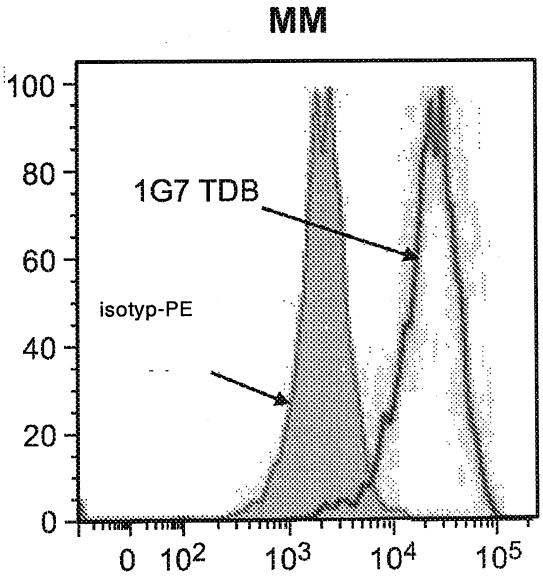


Fig.26D

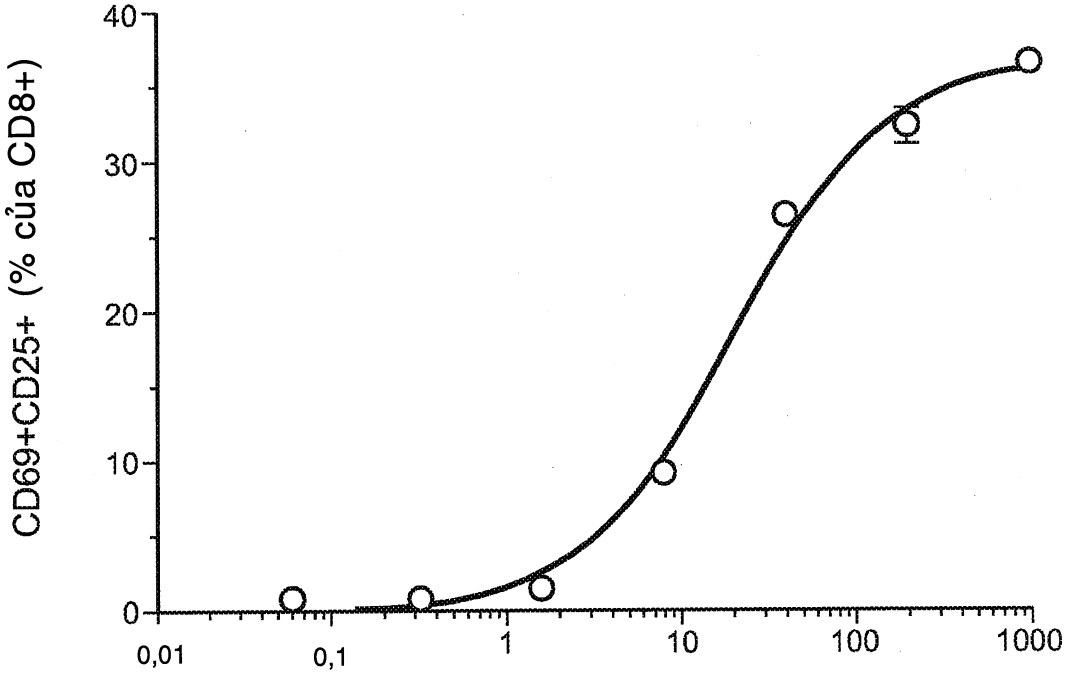


Fig.27A

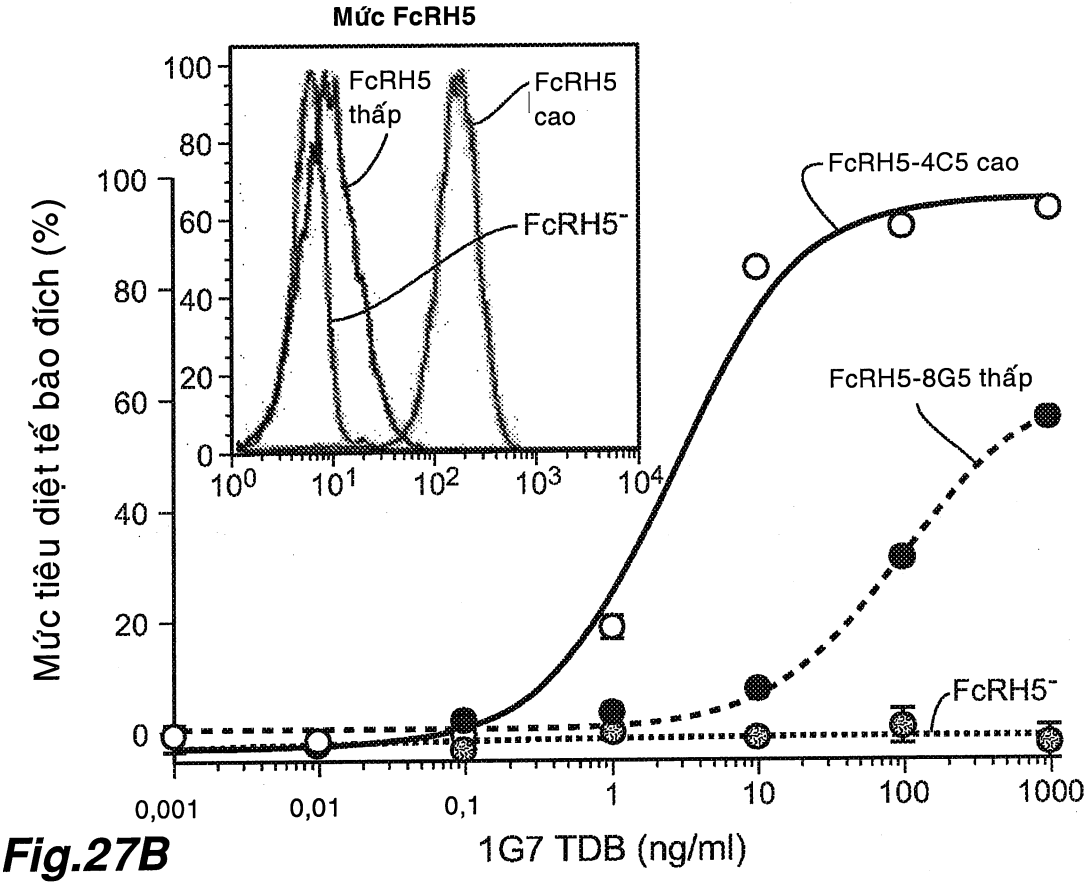


Fig.27B

Fig.27C

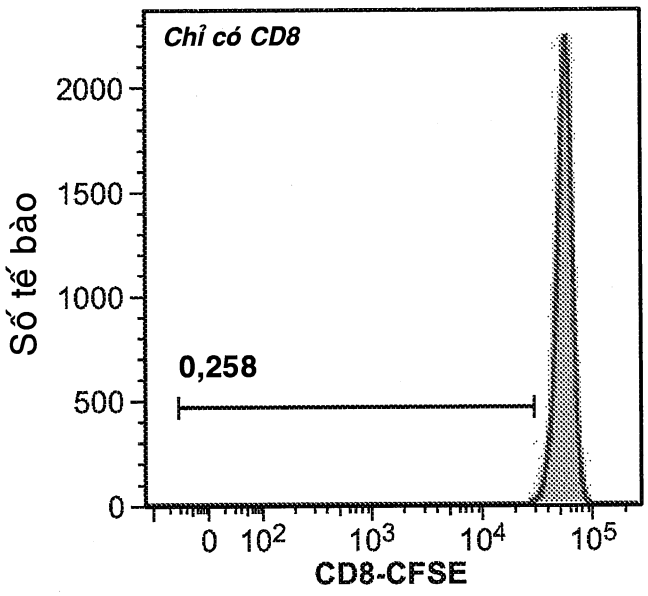


Fig.27D

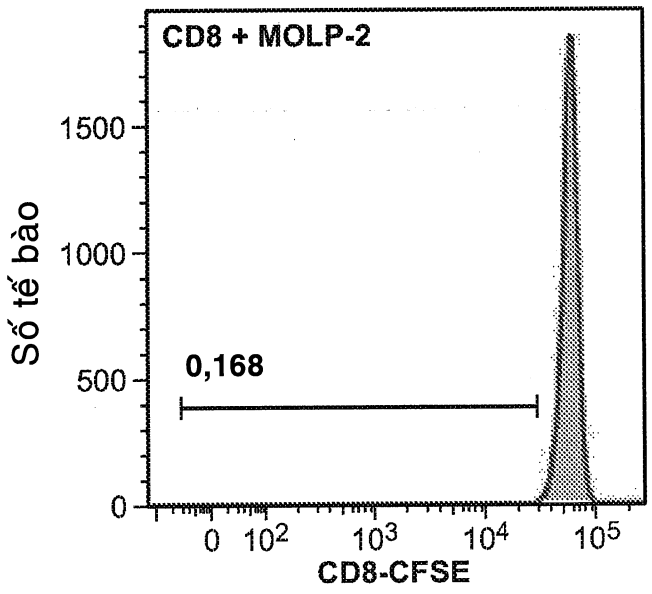
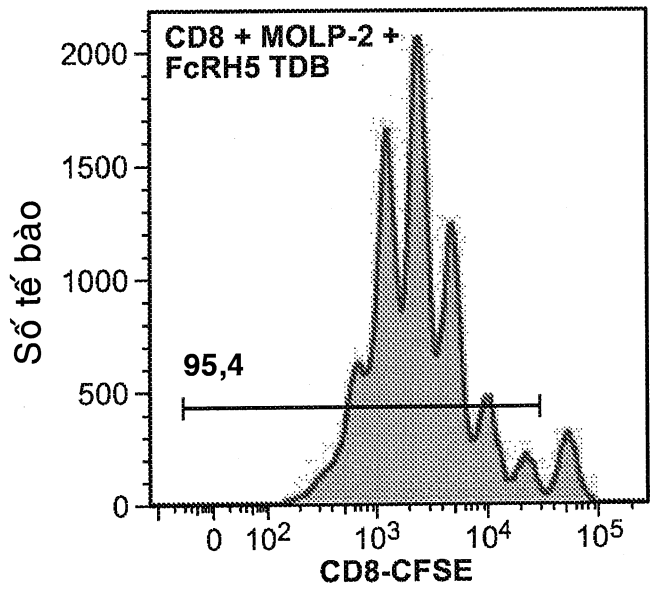


Fig.27E



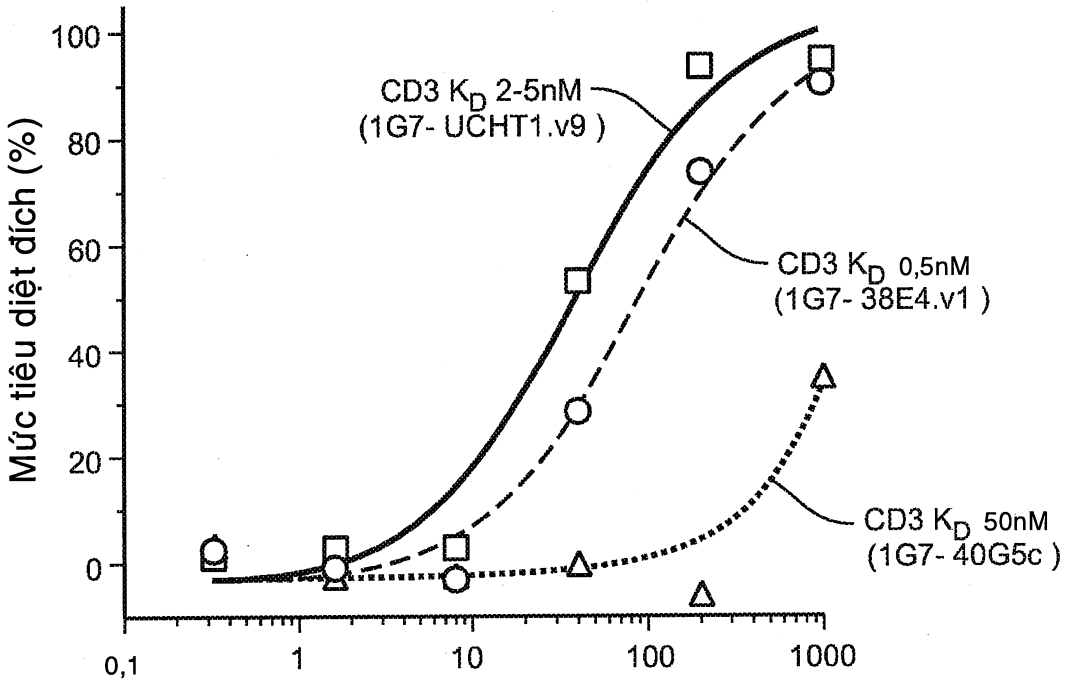


Fig.27F

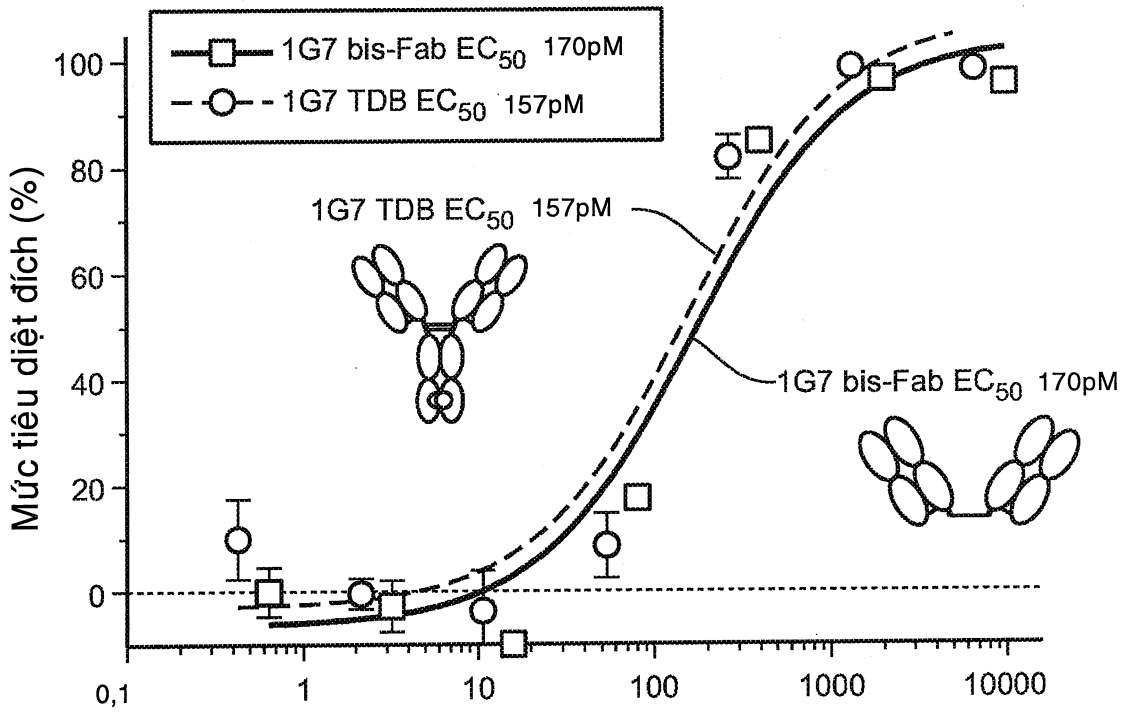


Fig.27G

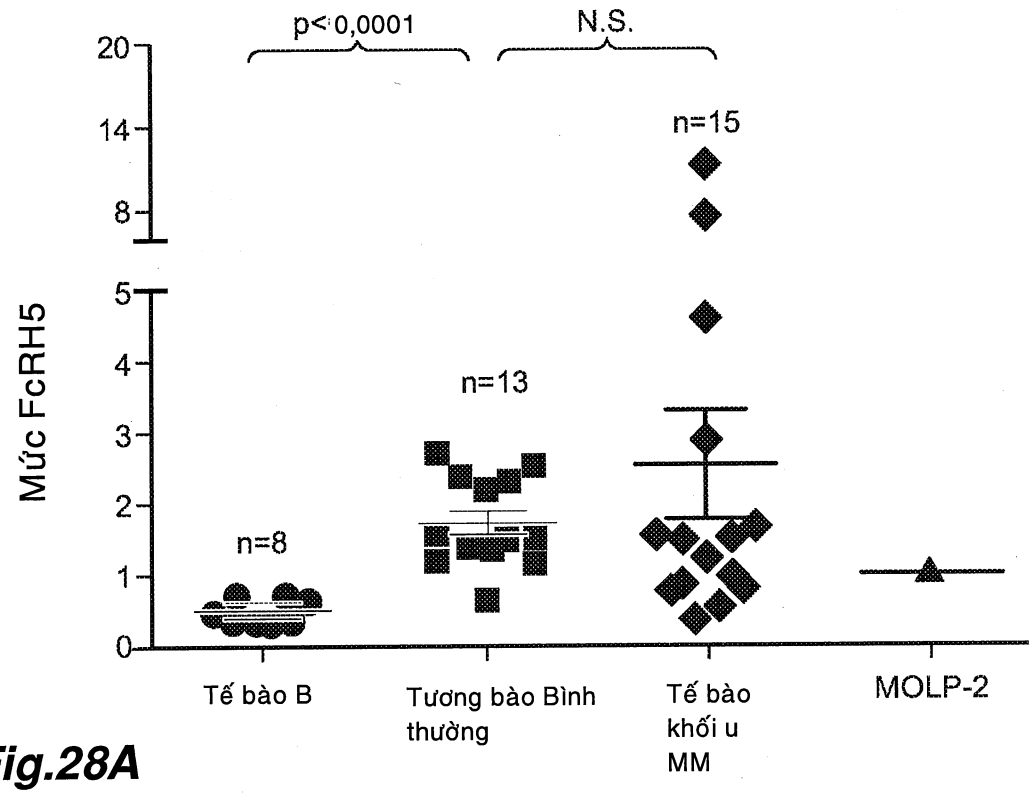


Fig.28A

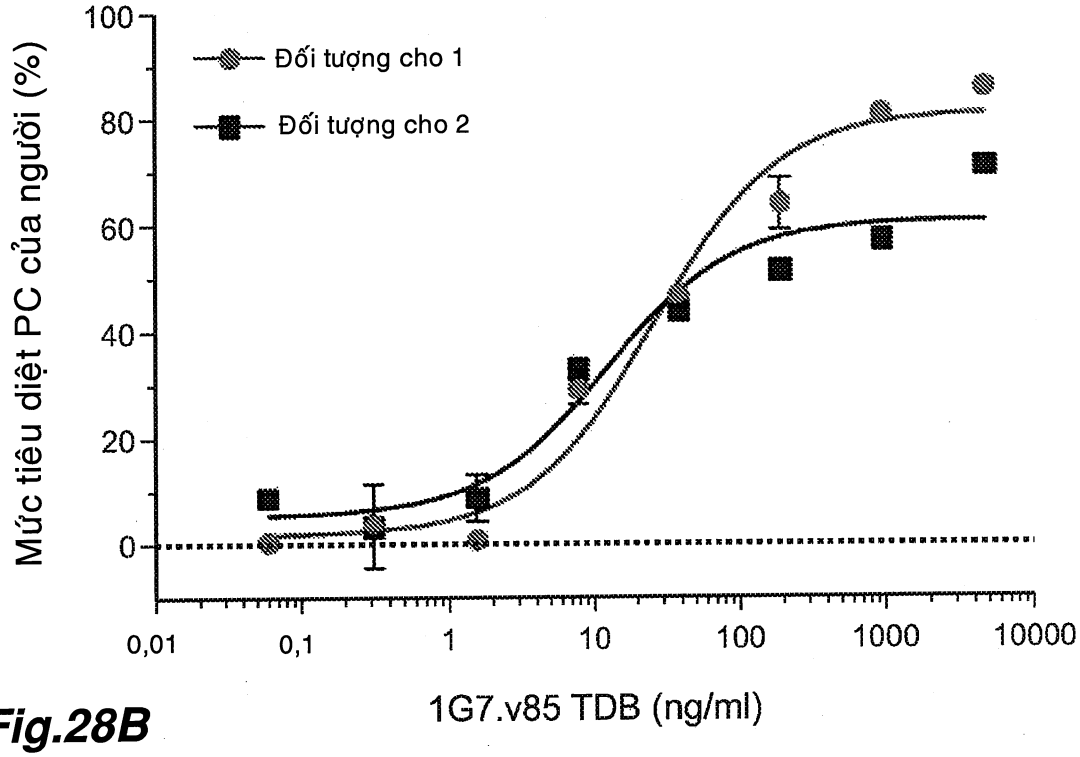


Fig.28B

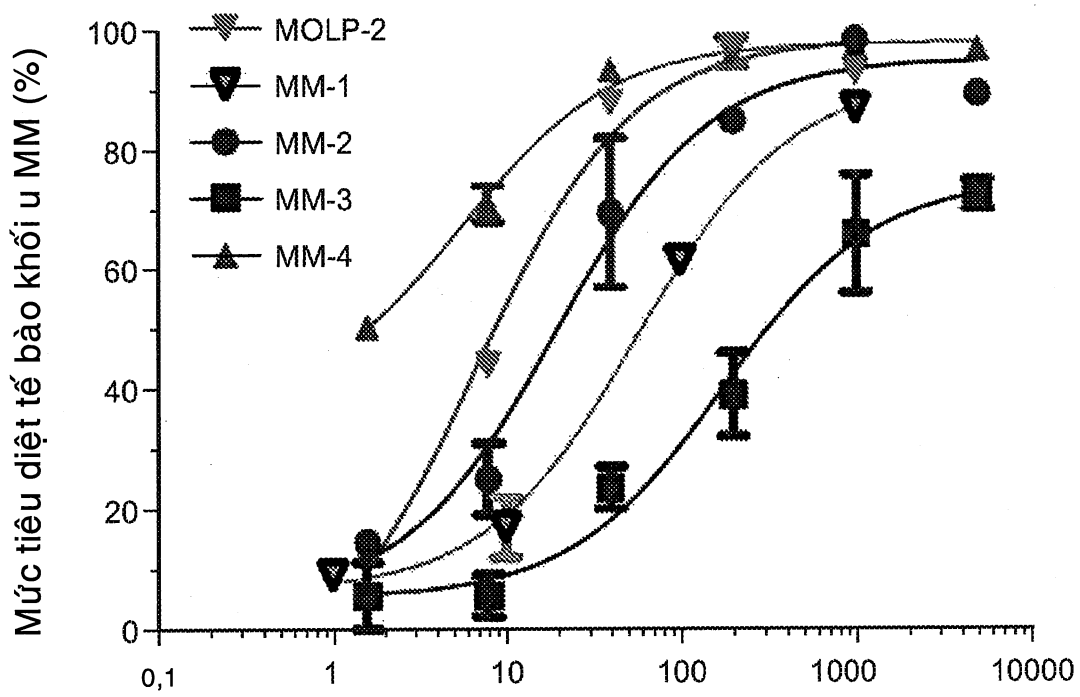


Fig.28C

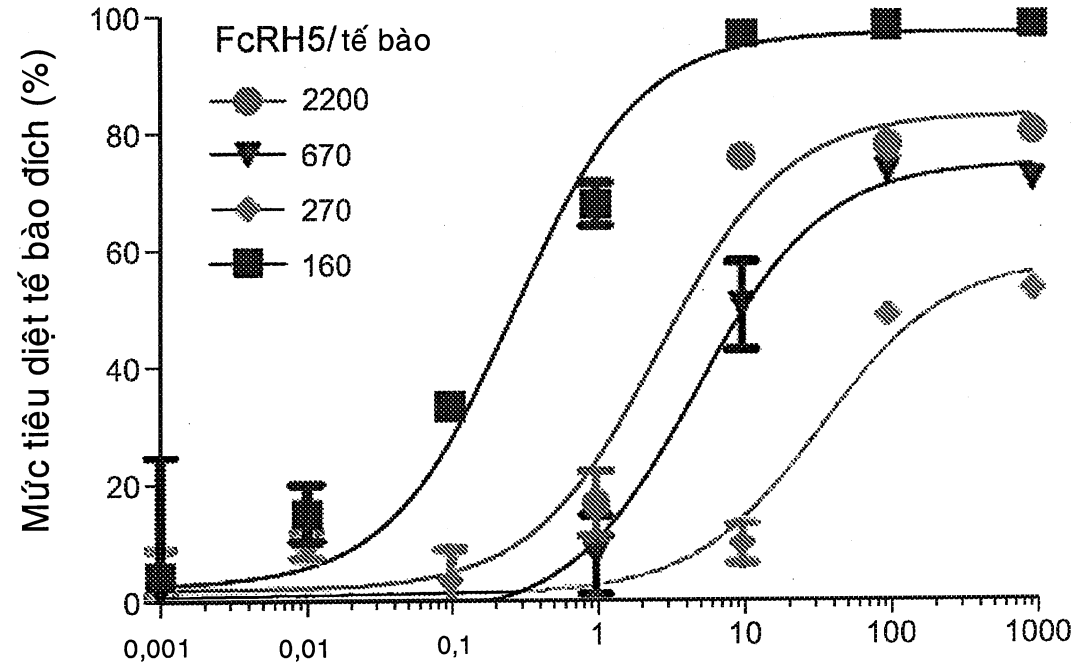


Fig.28D

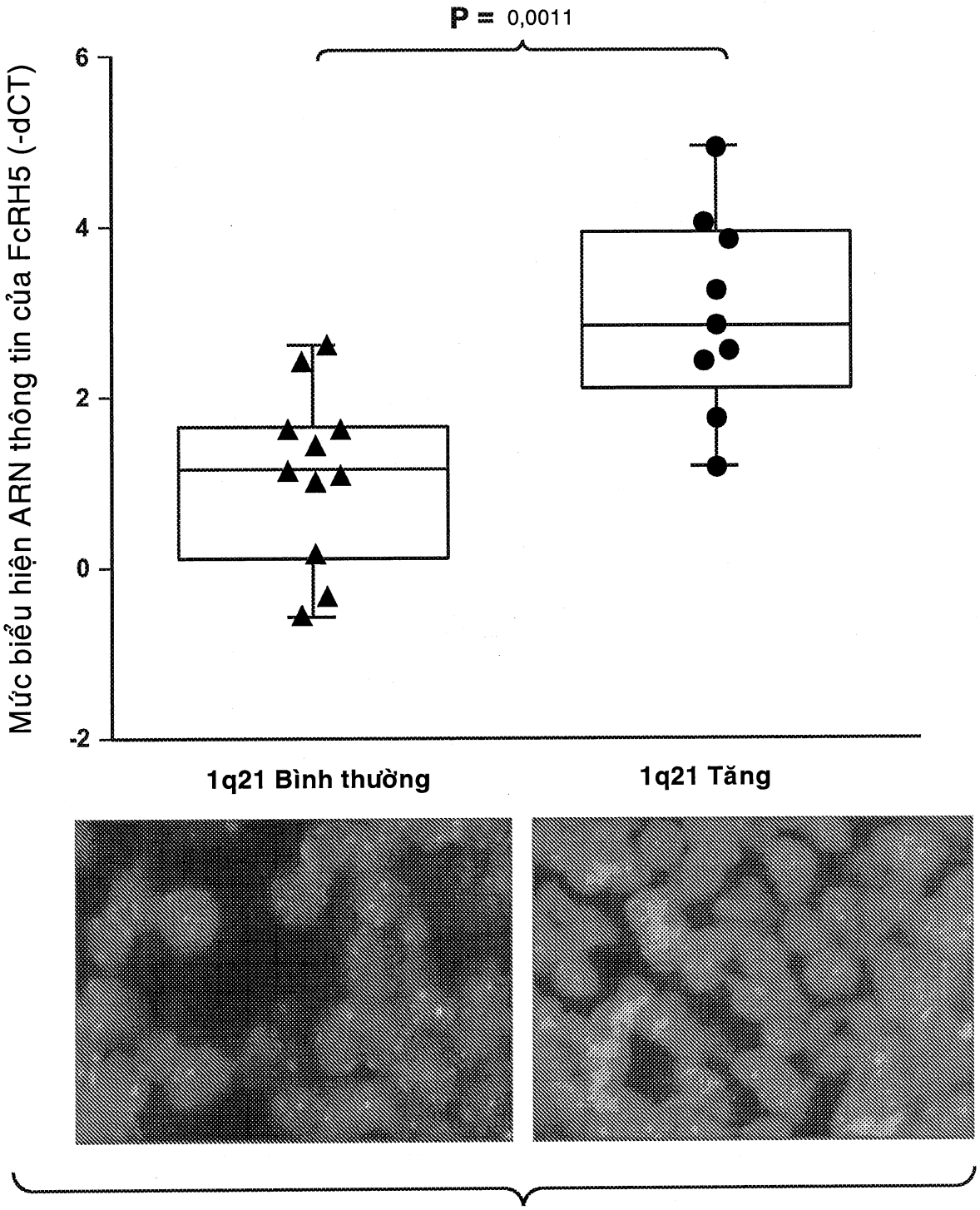

P = 0,0011
Mức biểu hiện ARN thông tin của FcRH5 (-dCT)
6
4
2
0
-2
1q21 Bình thường
1q21 Tăng

Fig.28E

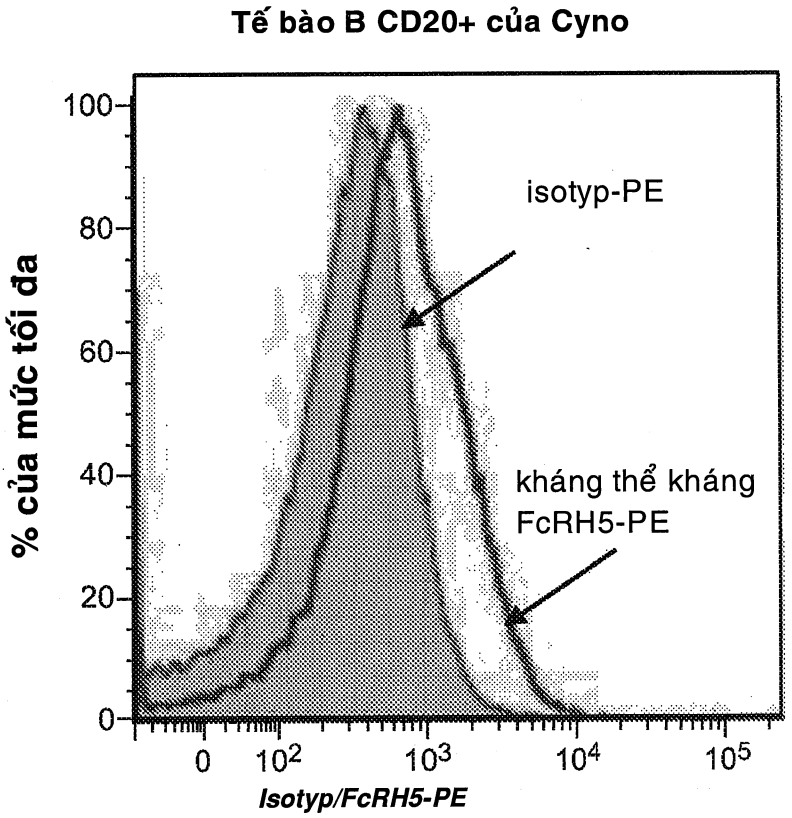


Fig.29A

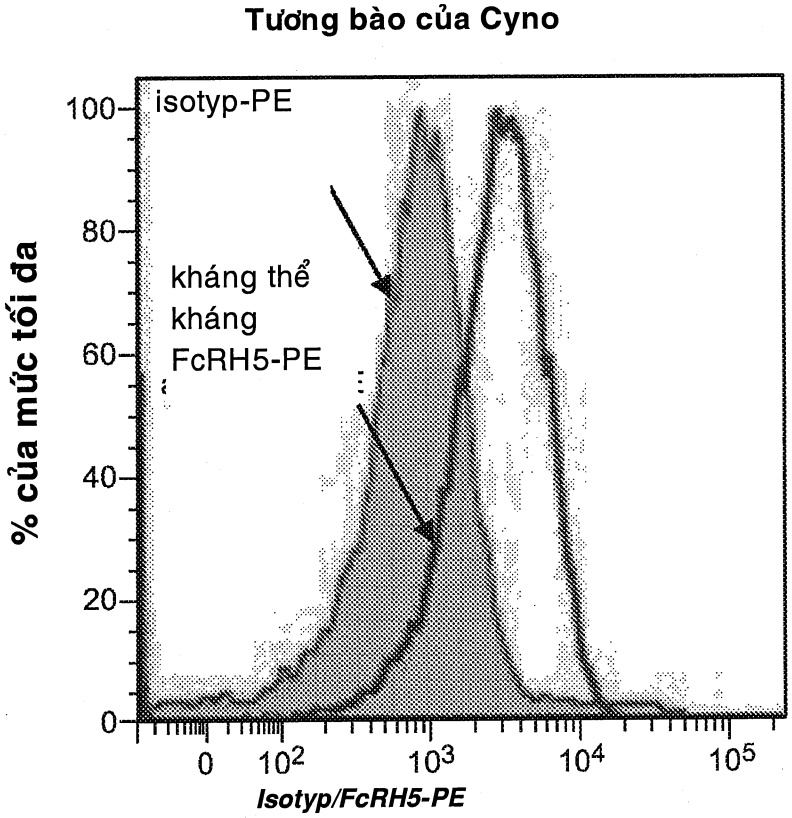


Fig.29B

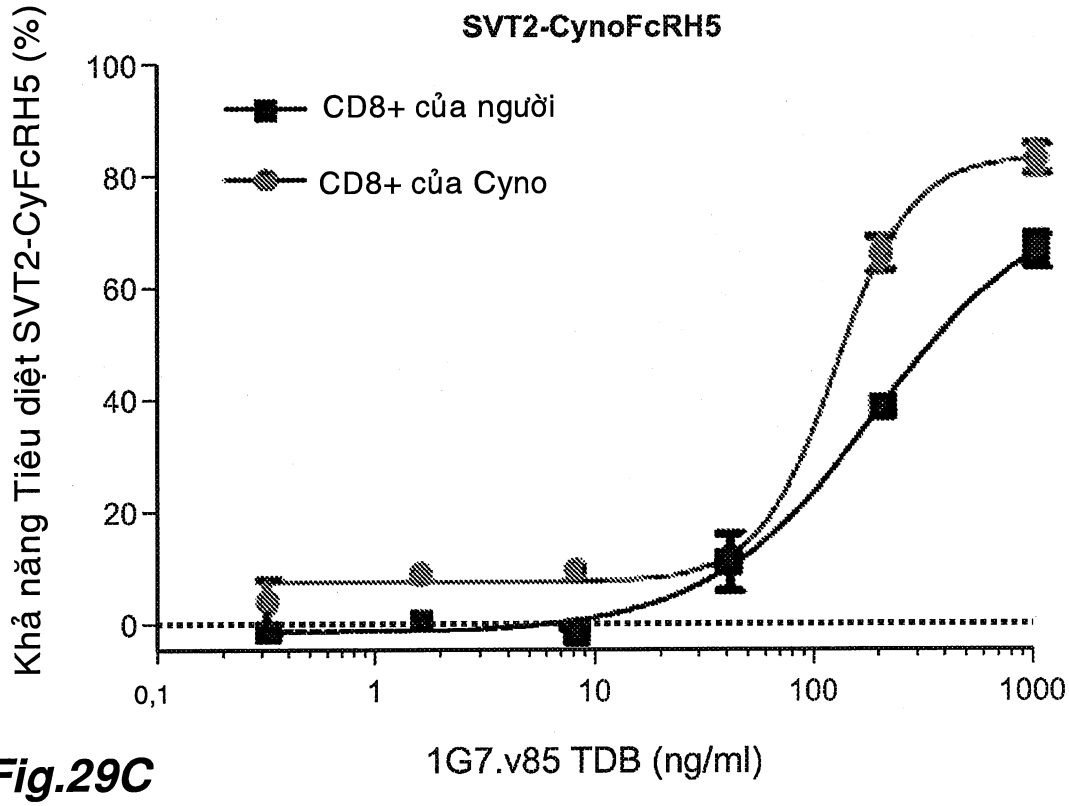


Fig.29C

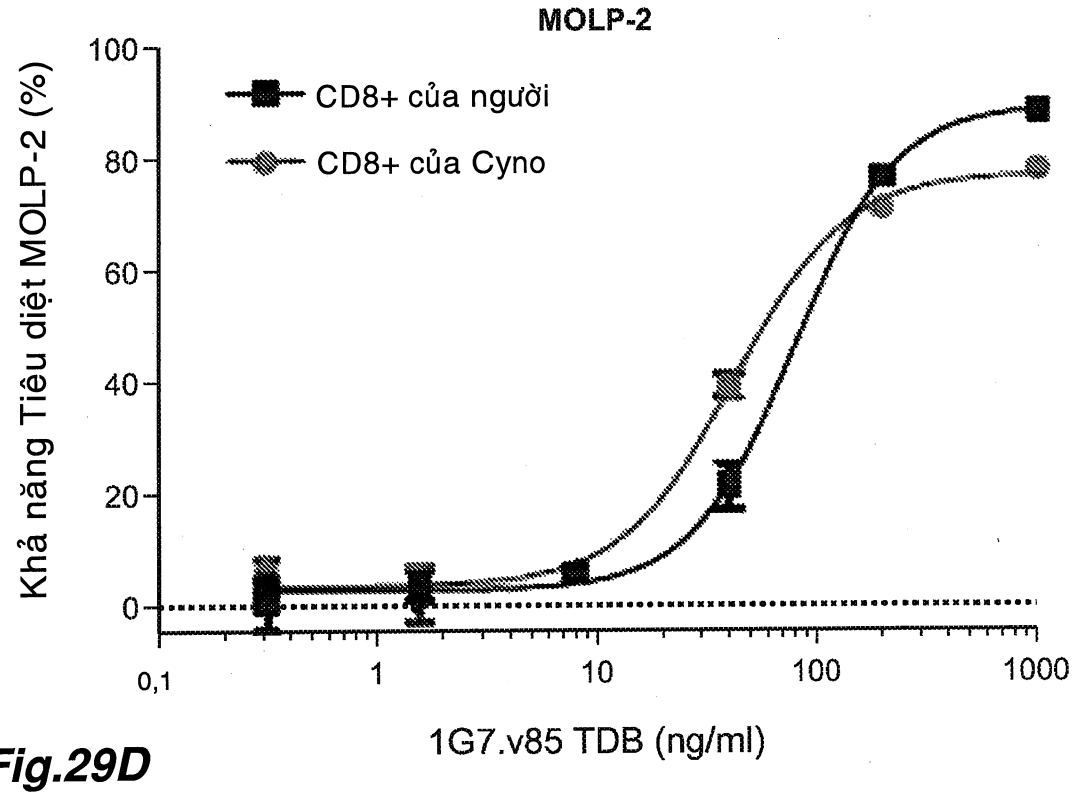


Fig.29D

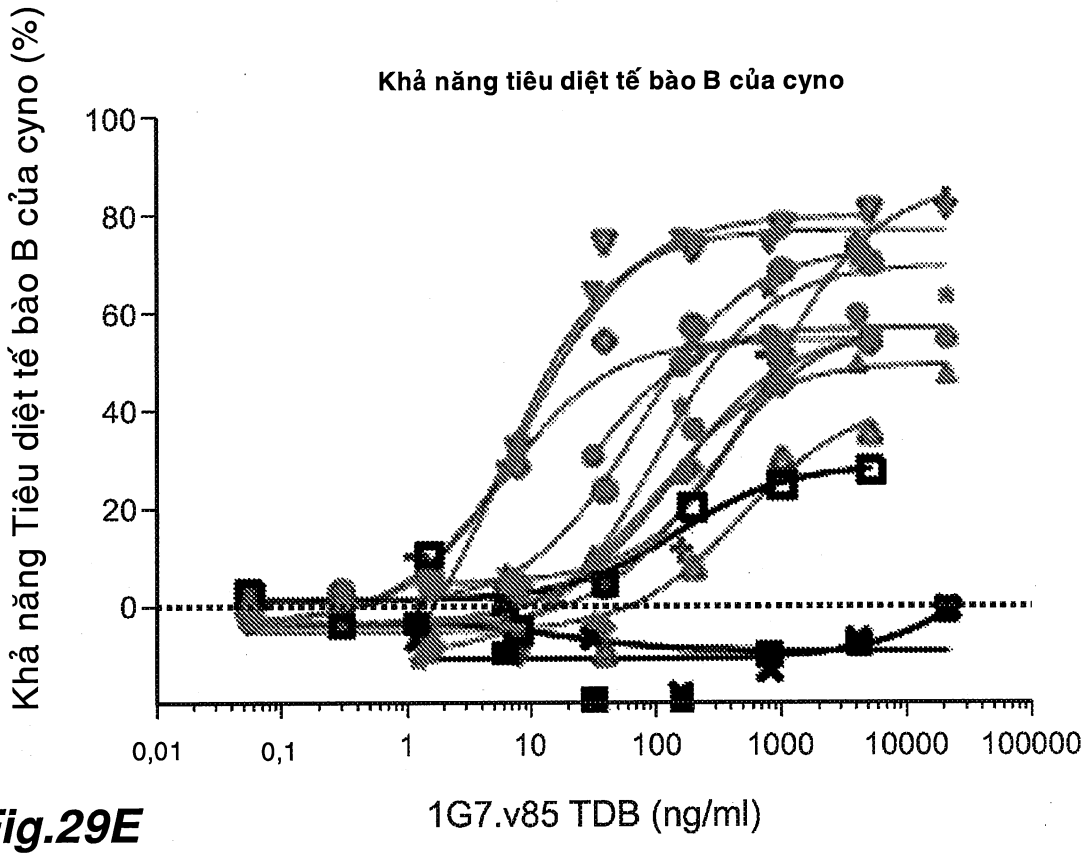


Fig.29E

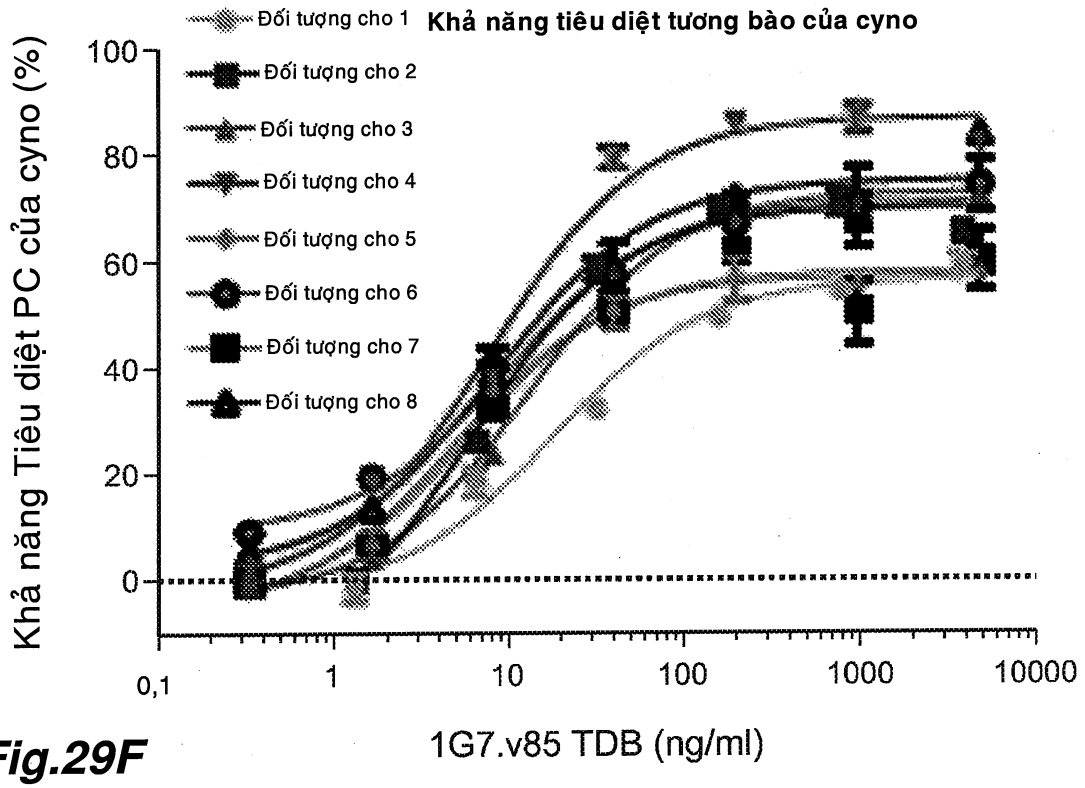


Fig.29F

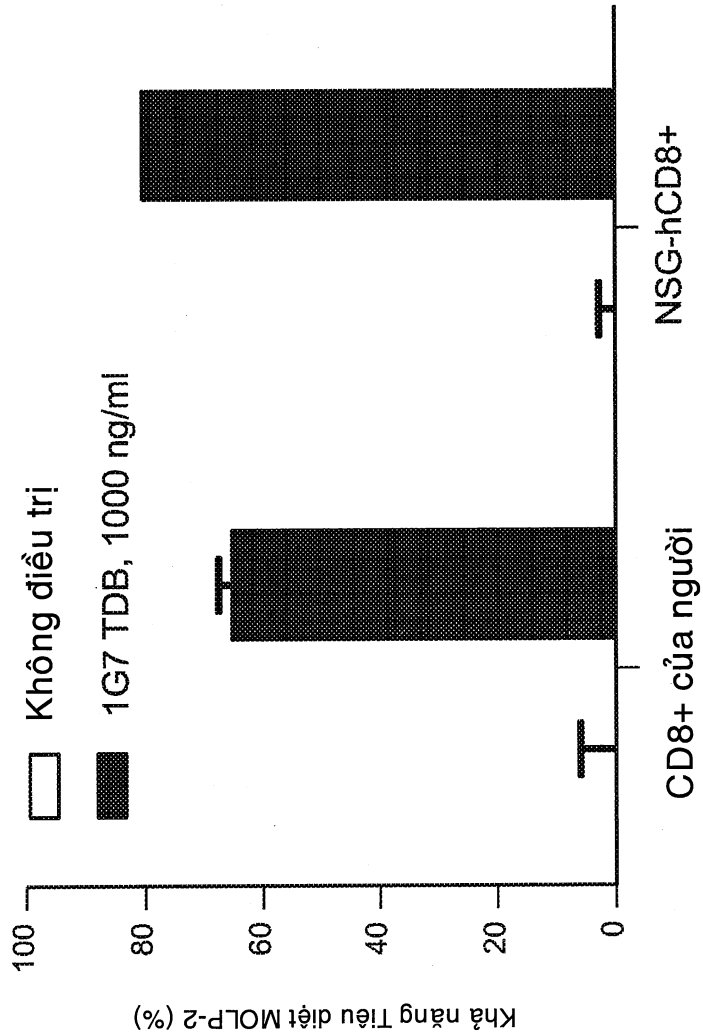

Không điều trị
1G7 TDB, 1000 ng/ml
Khả năng Tiêu diệt MOLP-2 (%)
100
80
60
40
20
0
CD8+ của người
NSG-hCD8+

Fig.30A

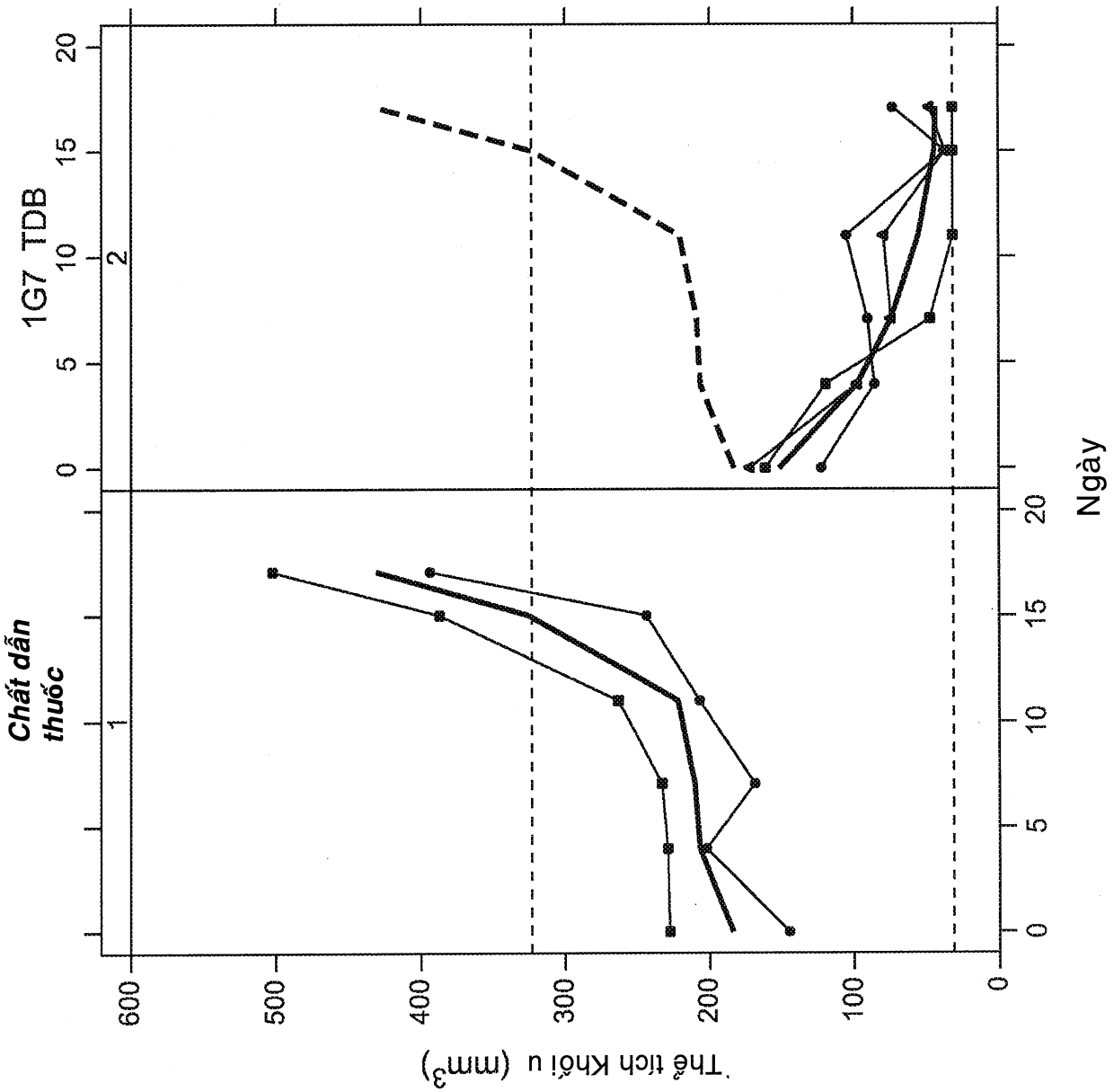
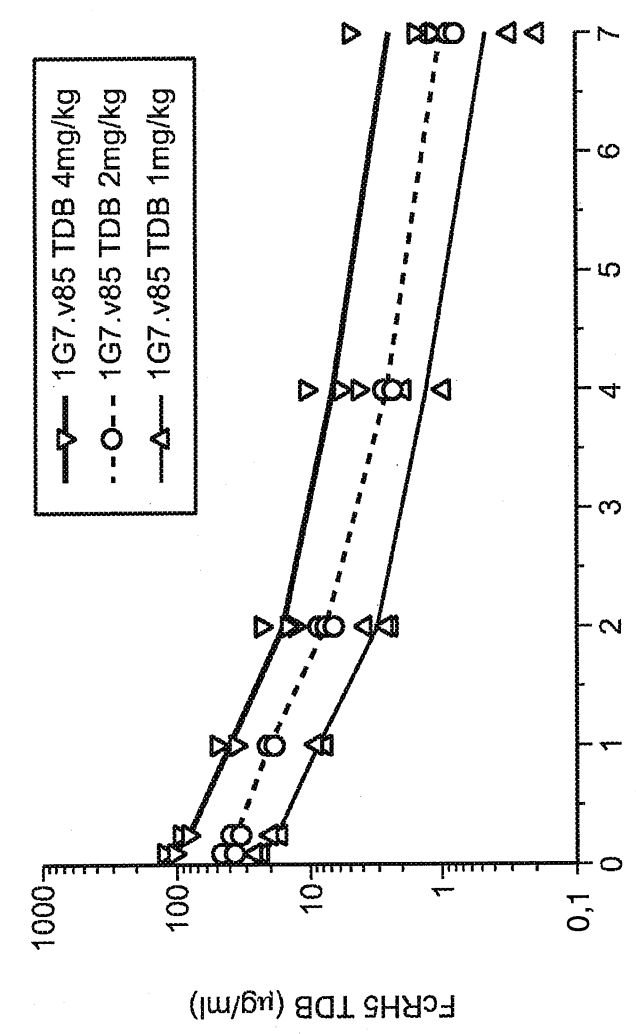
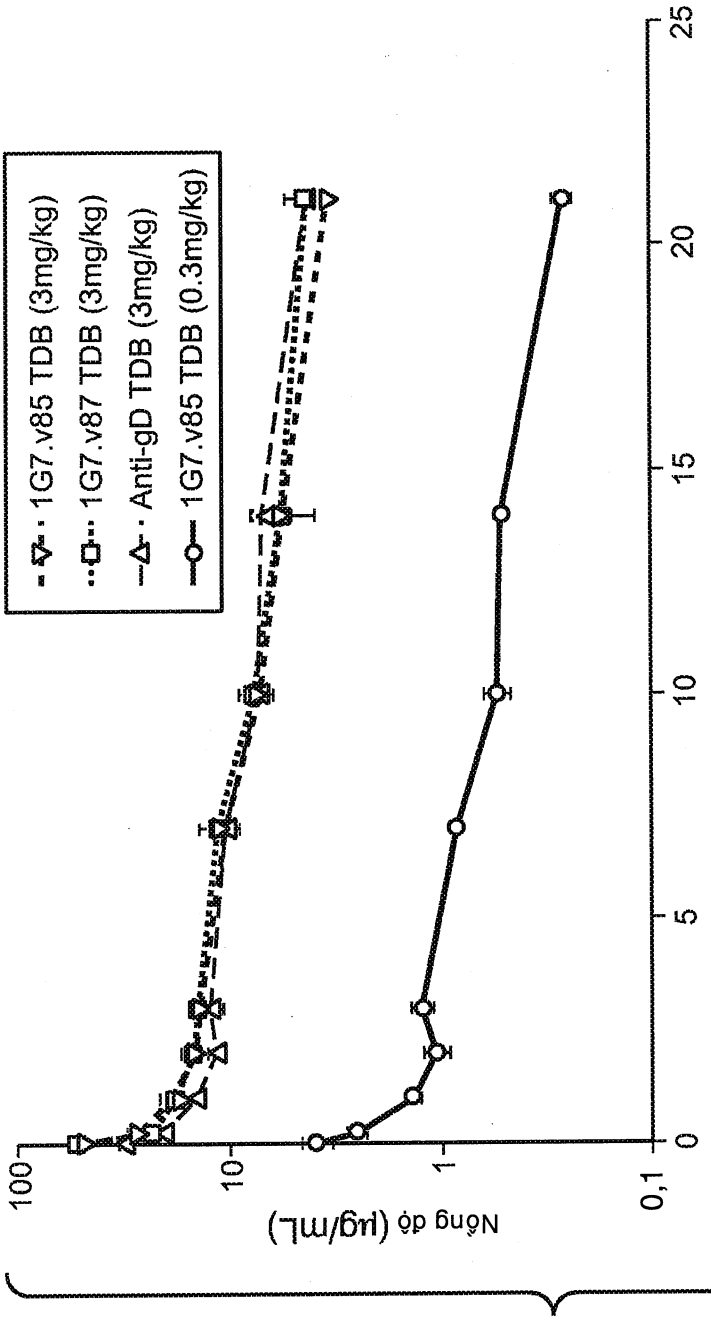

Chất dẫn thuốc
1G7 TDB
1
2
Thể tích khối u (mm3)
Ngày
0
100
200
300
400
500
600
0
5
10
15
20

Fig.30B



Liều dùng (mg/kg)	Cmax (µg/mL)	AUC_{inf} (ngày*µg/mL)	AUC_{0-7} (ngày*µg/mL)	CL (mL/ngày/kg)
1	26,5 ±l0,4	30,1 ±4	28,7 ±2	33,6 ±4
2	47,9 ±2	62,4 ±2	60,3 ±2	32,0 ±1
4	129±21	139±35	133±28	29,8 ±7

Fig.31A



Nhóm	AUC sau cùng (ngày*µg/mL)	Cmax (µg/mL)	CL (mL/kg/ ngày)
0,3 mg/kg	15,8	3,9	15,7
3 mg/kg	190,5	50,2	12,4
Kháng thể kháng gD 3 mg/kg	186	31,9	11,4

Fig.31B

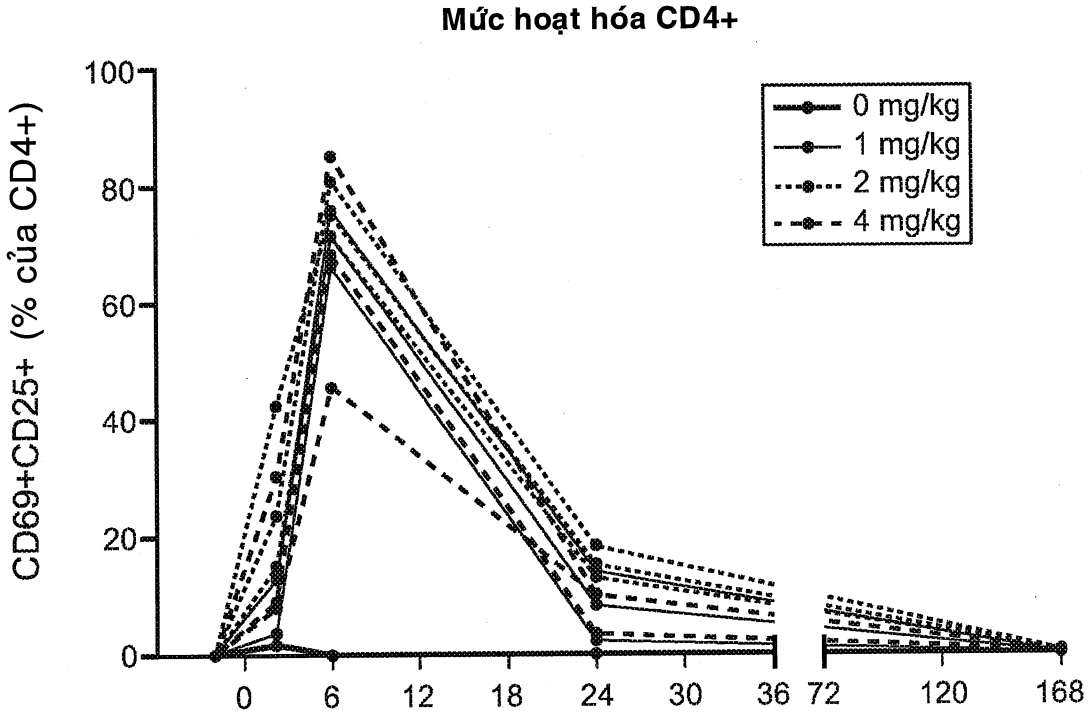


Fig.31C

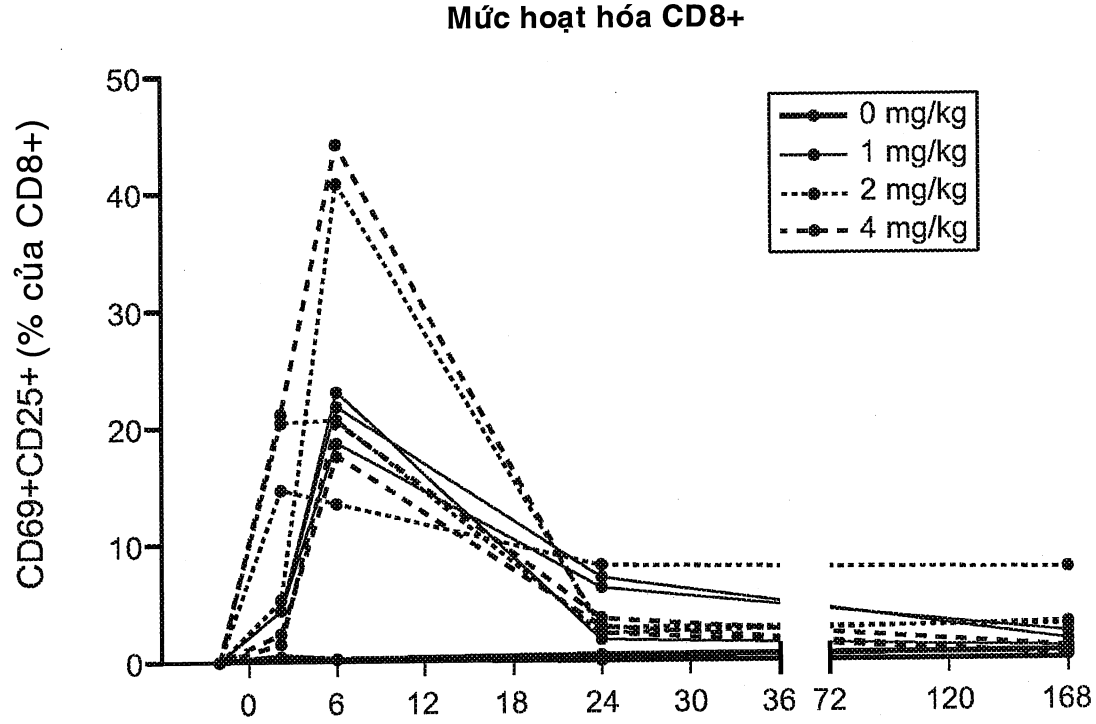


Fig.31D

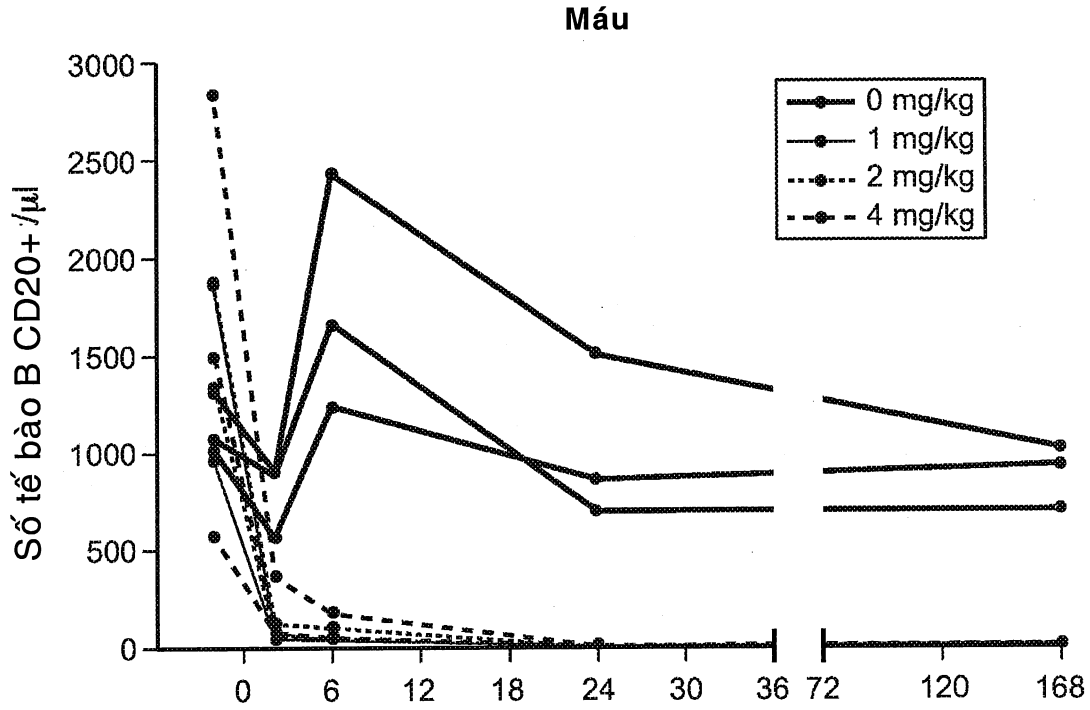


Fig.31E

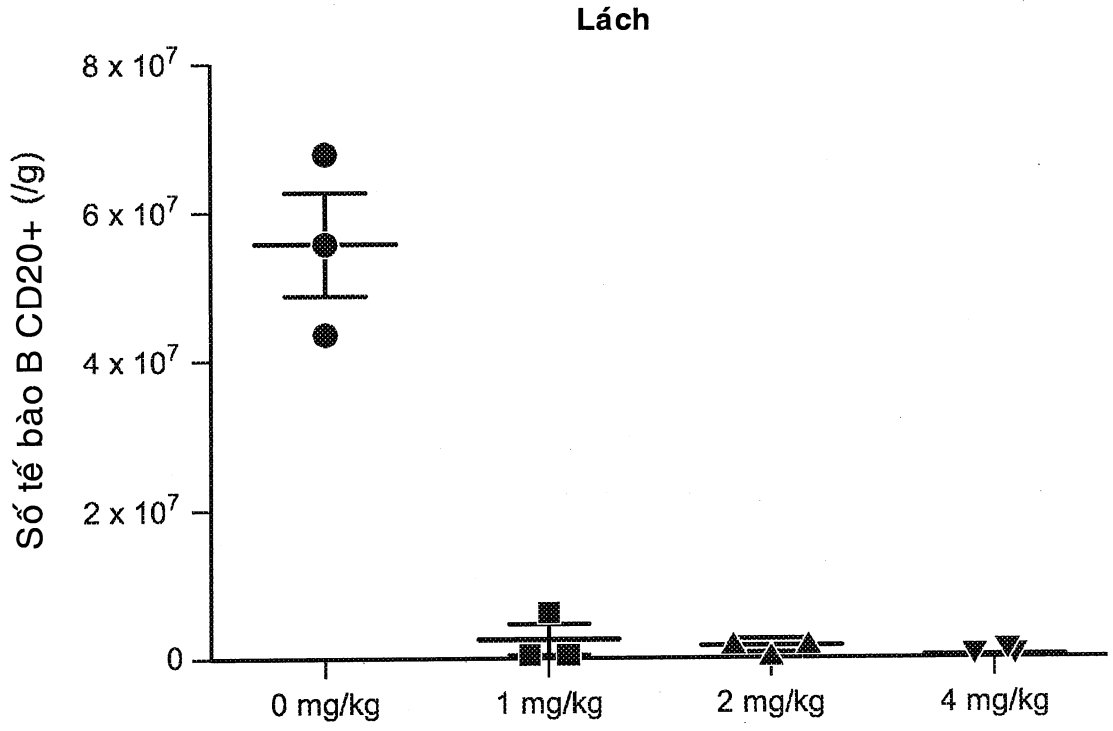


Fig.31F

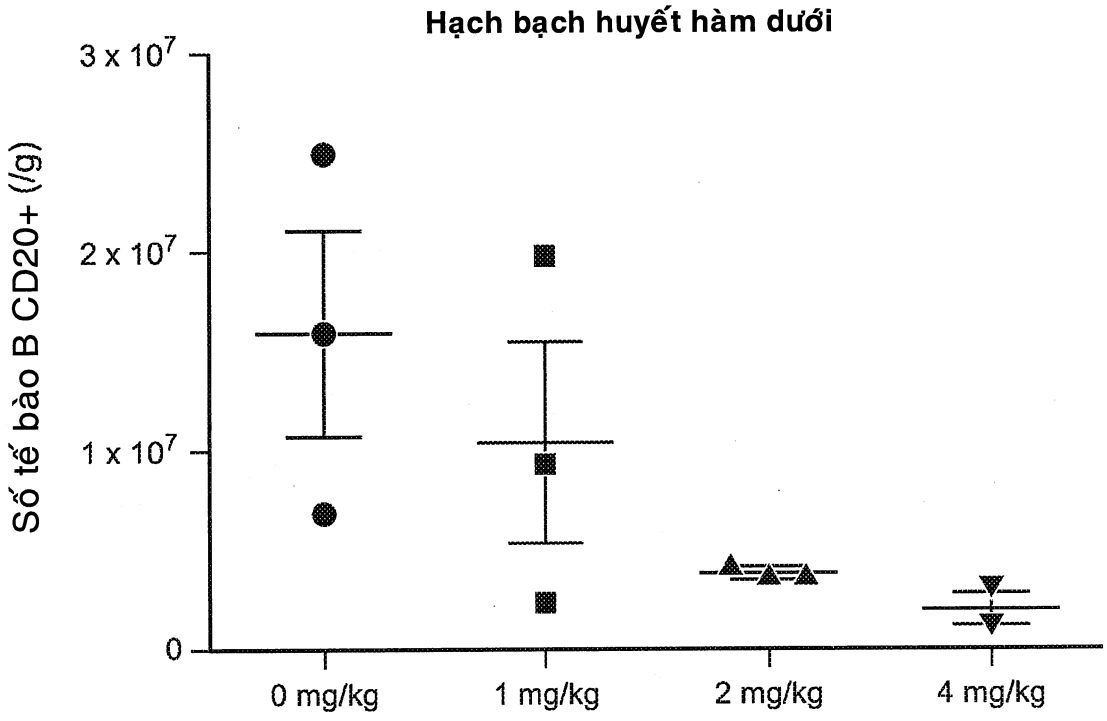


Fig.31G

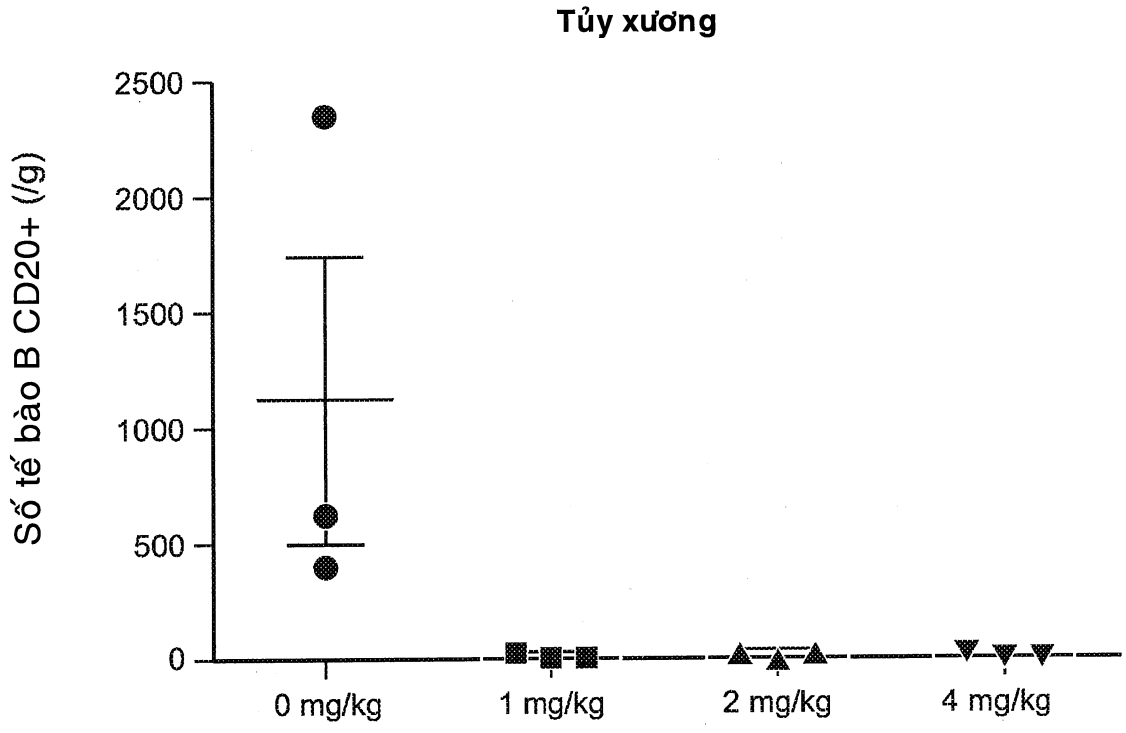


Fig.31H

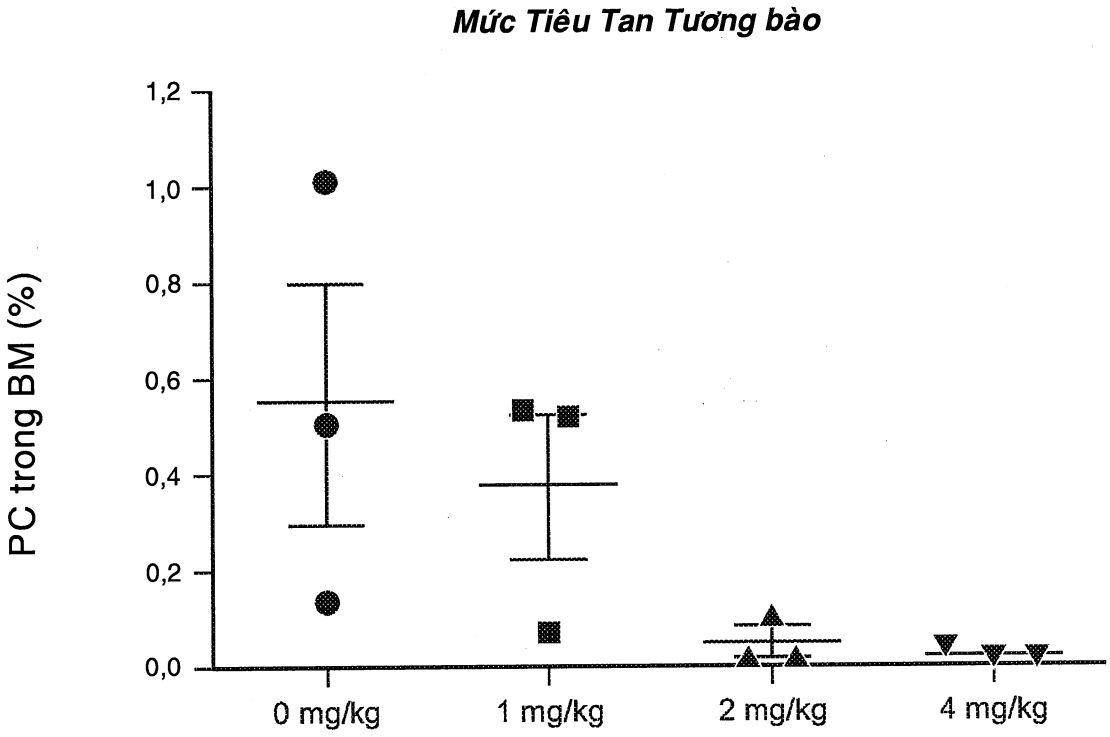


Fig.32I

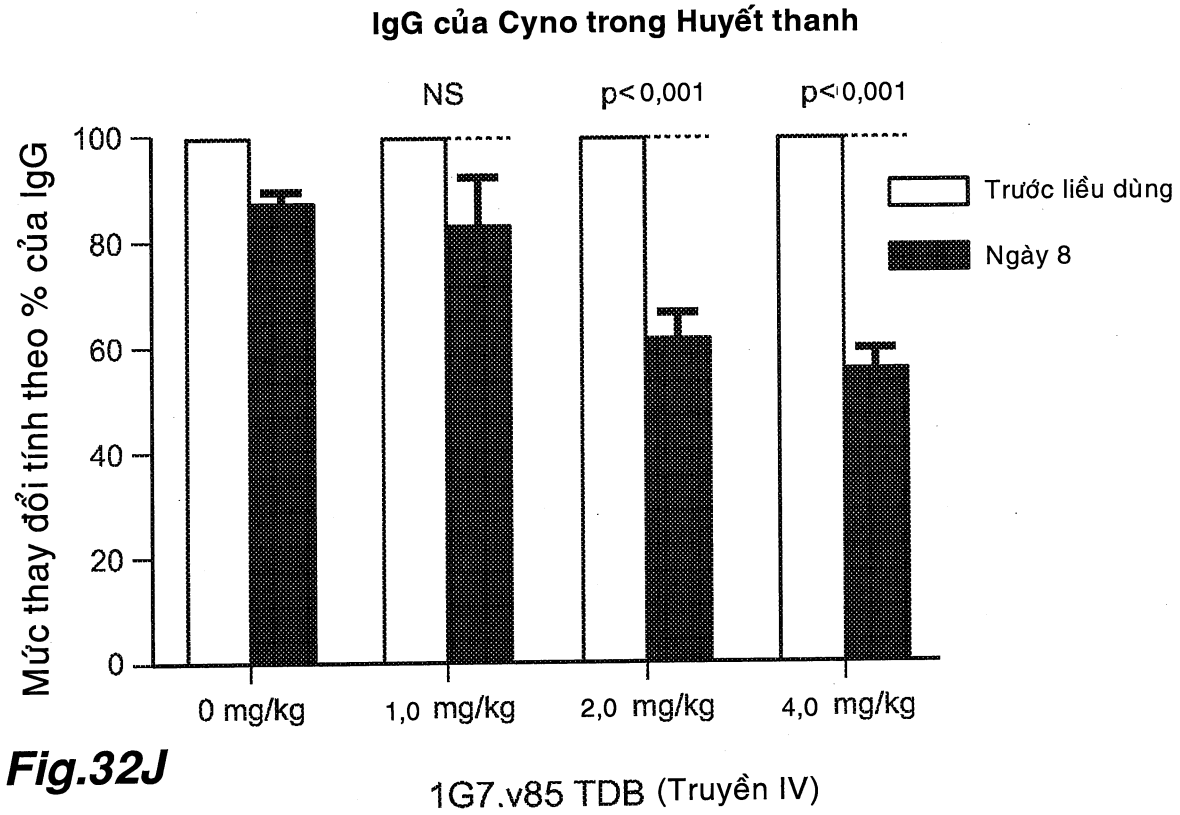


Fig.32J

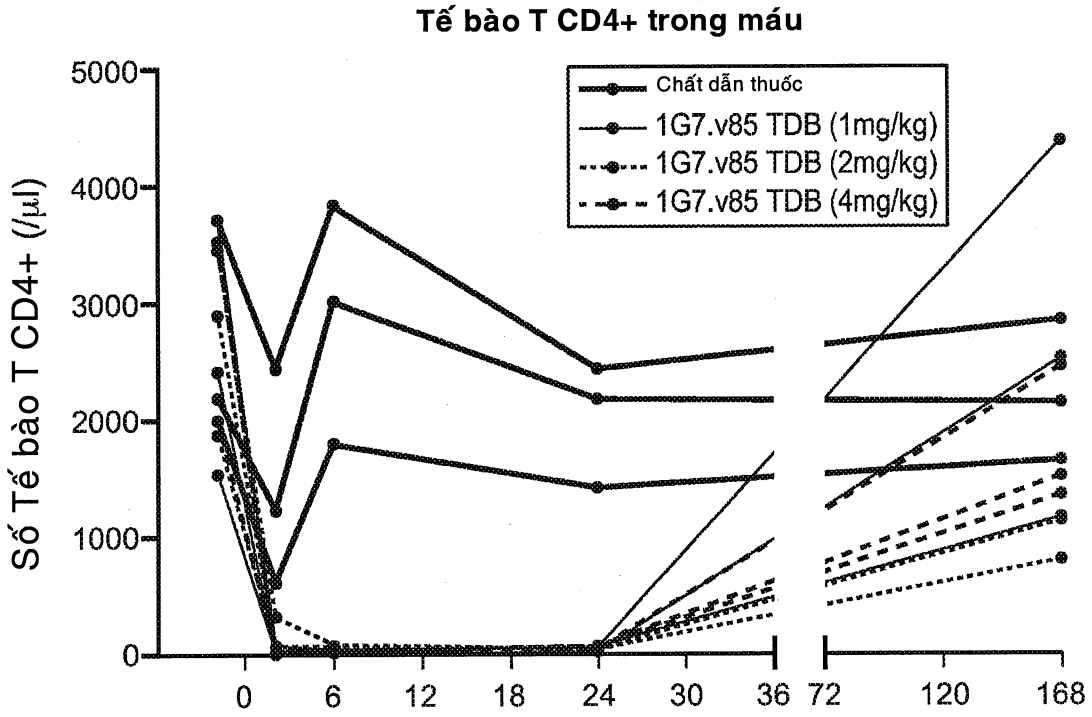


Fig.32A

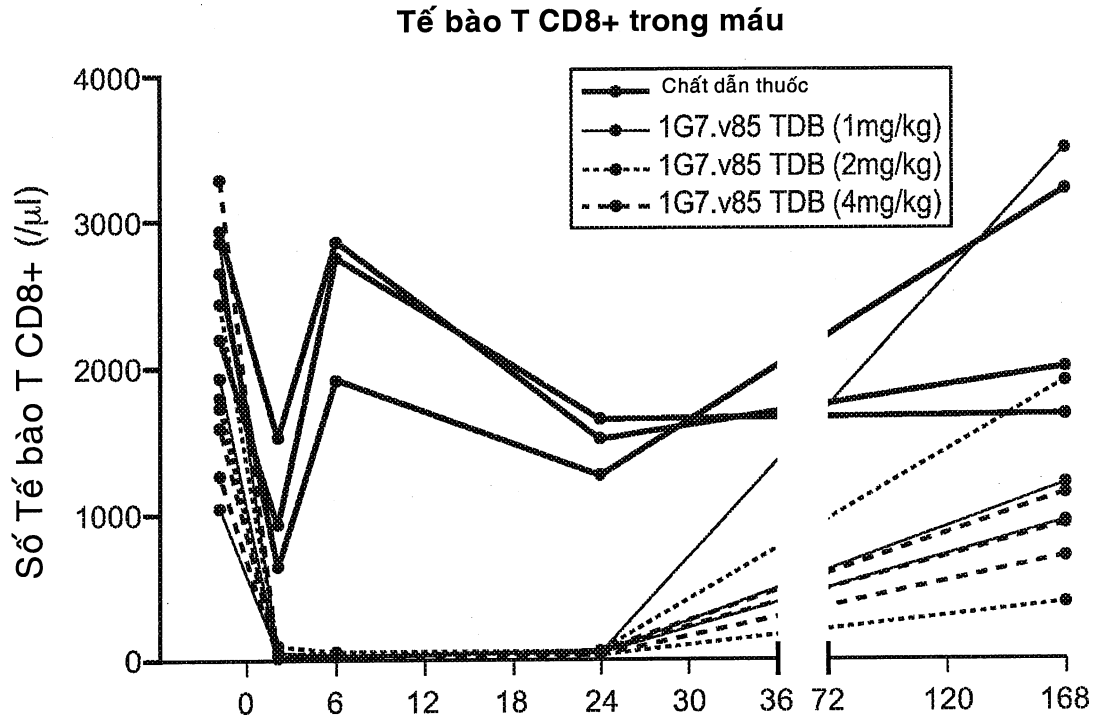


Fig.32B

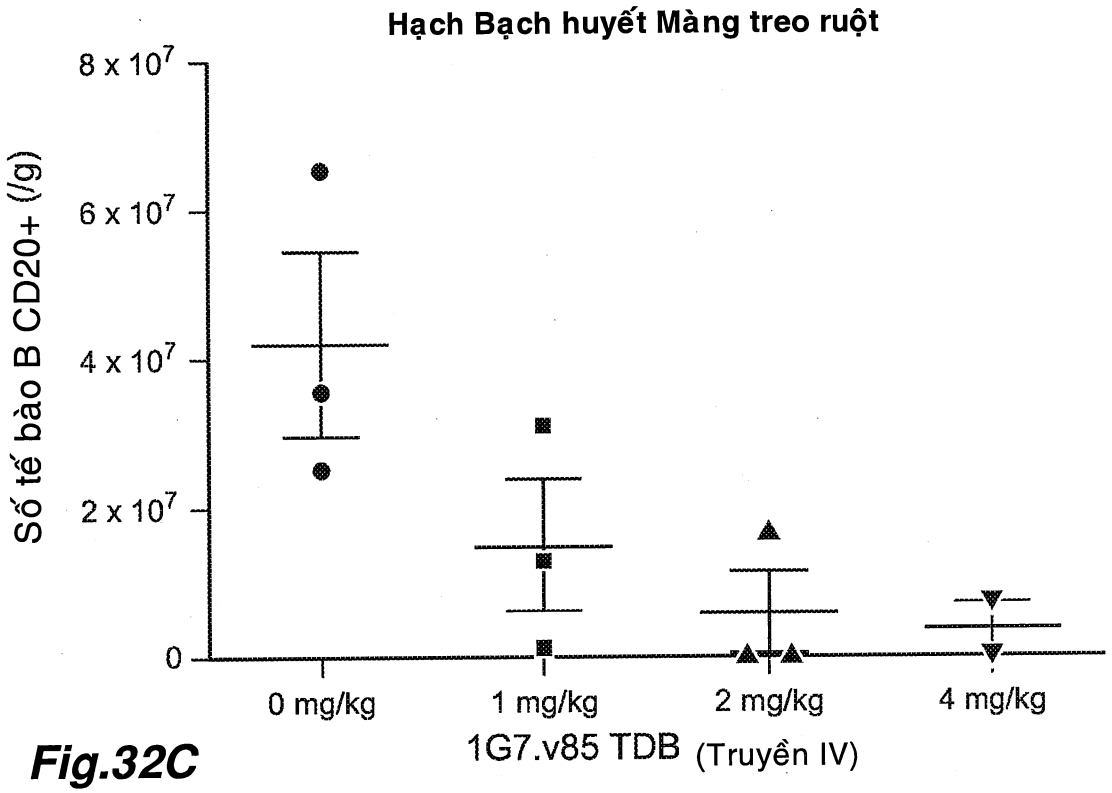


Fig.32C

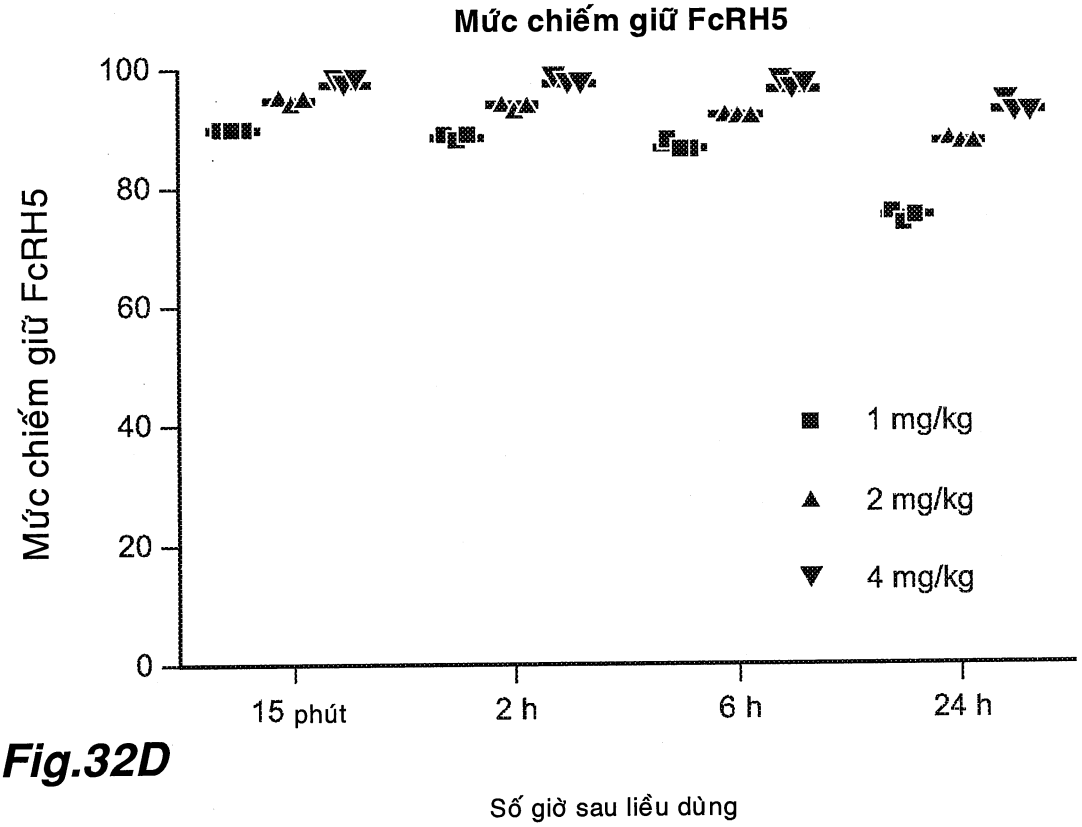


Fig.32D

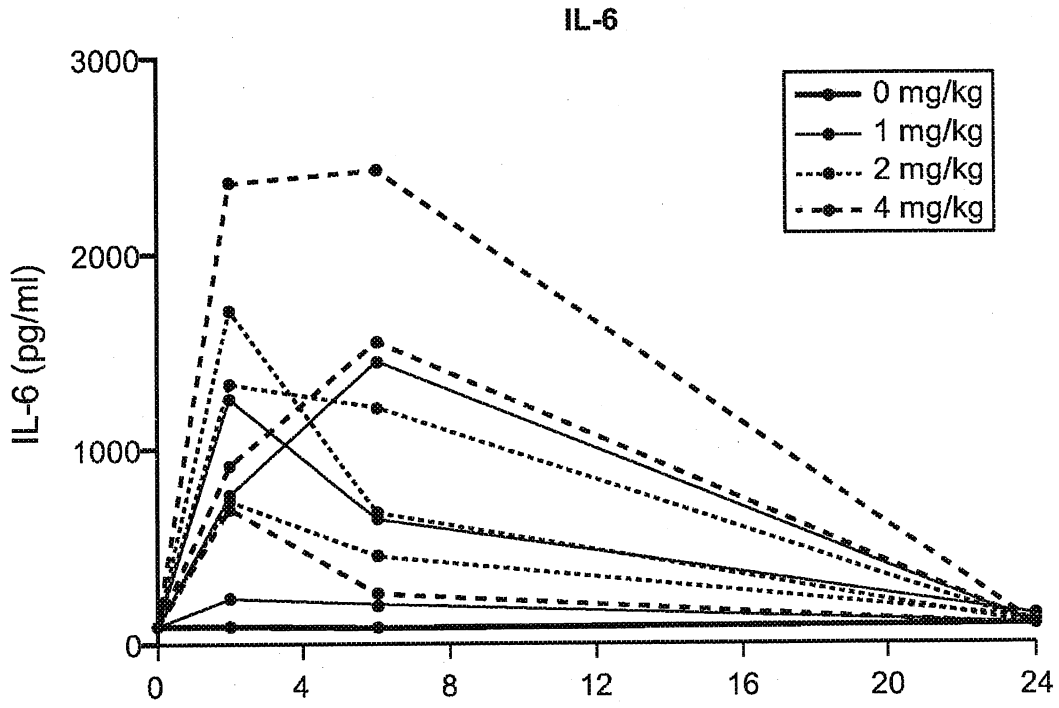


Fig.33A

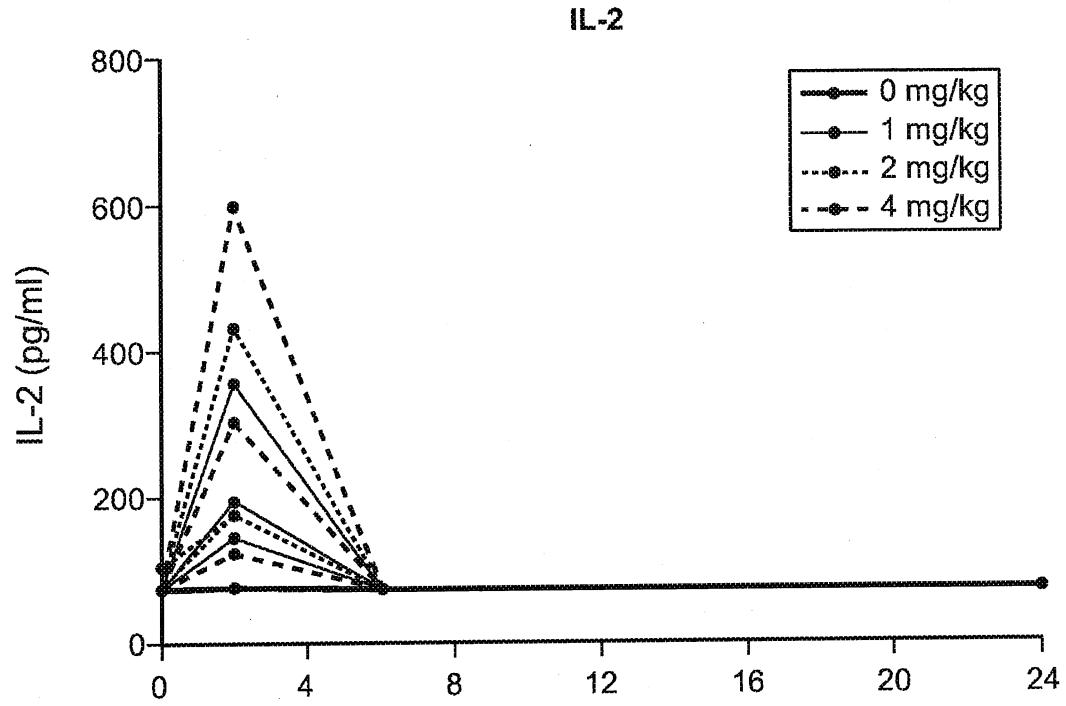


Fig.33B

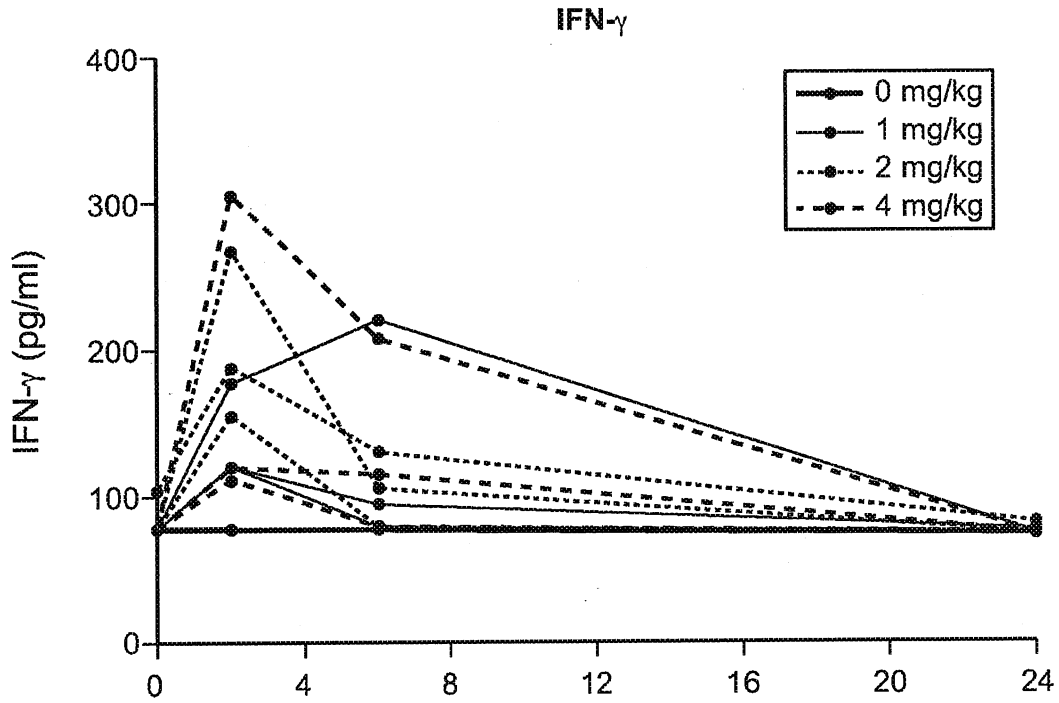


Fig.33C

Số giờ sau liều dùng

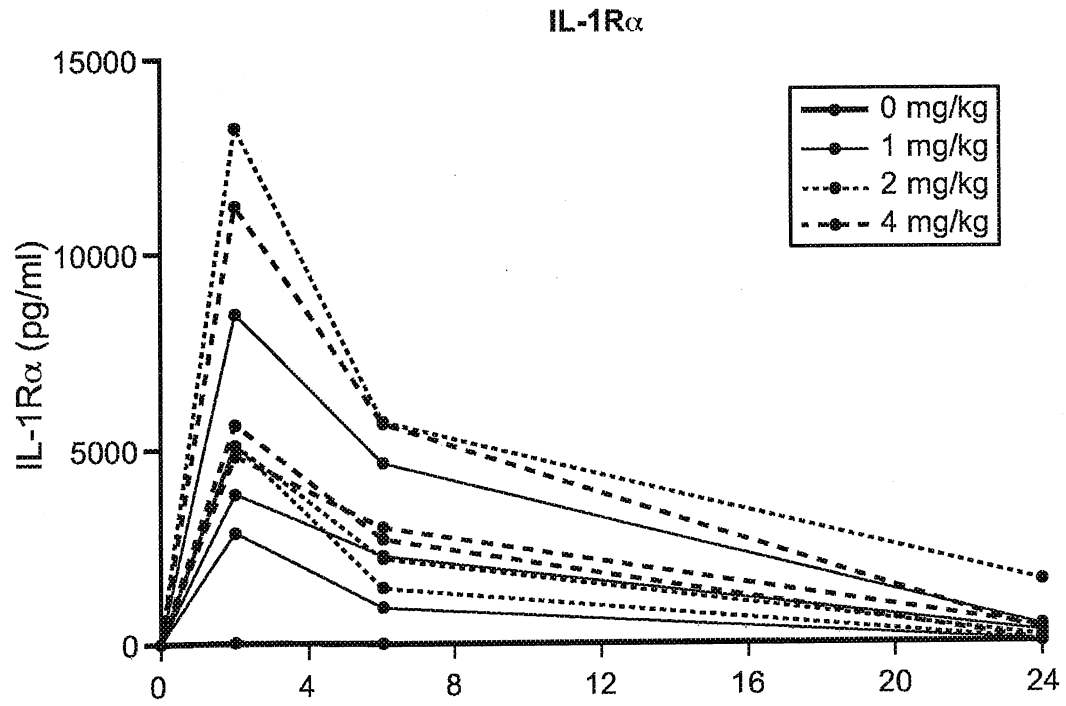


Fig.33D

Số giờ sau liều dùng

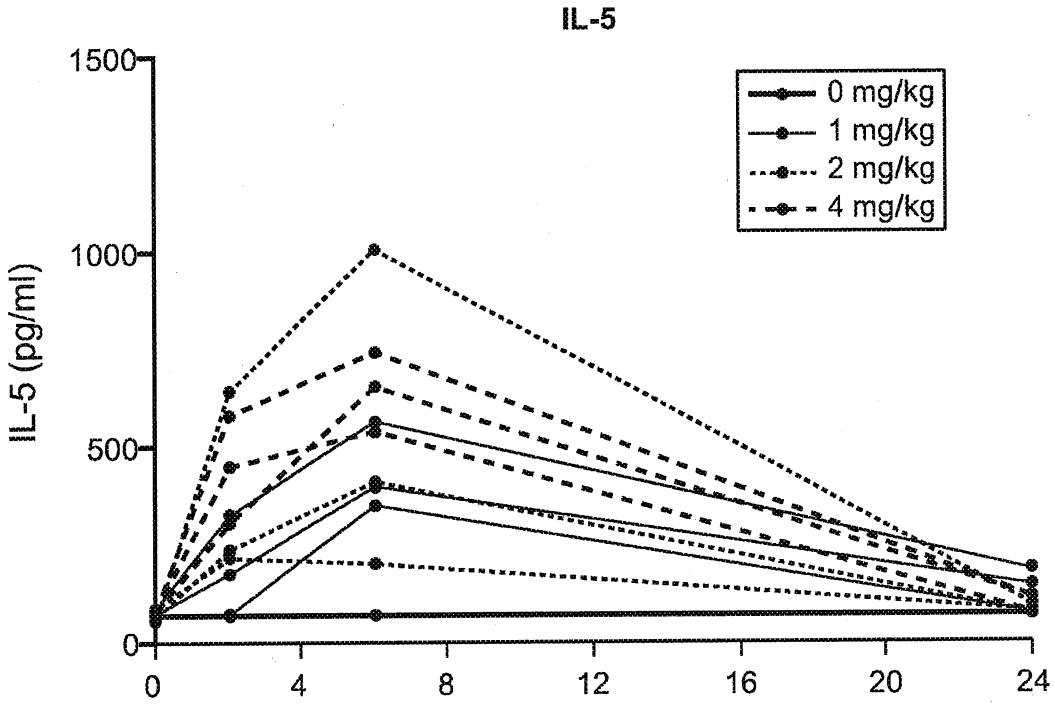


Fig.33E

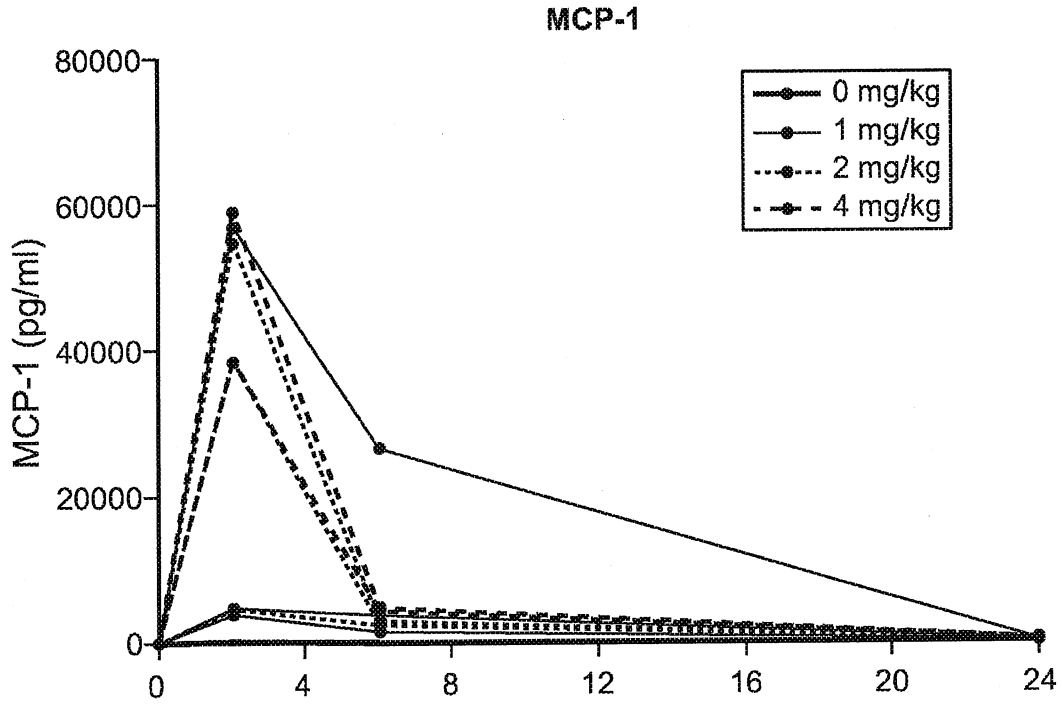


Fig.33F

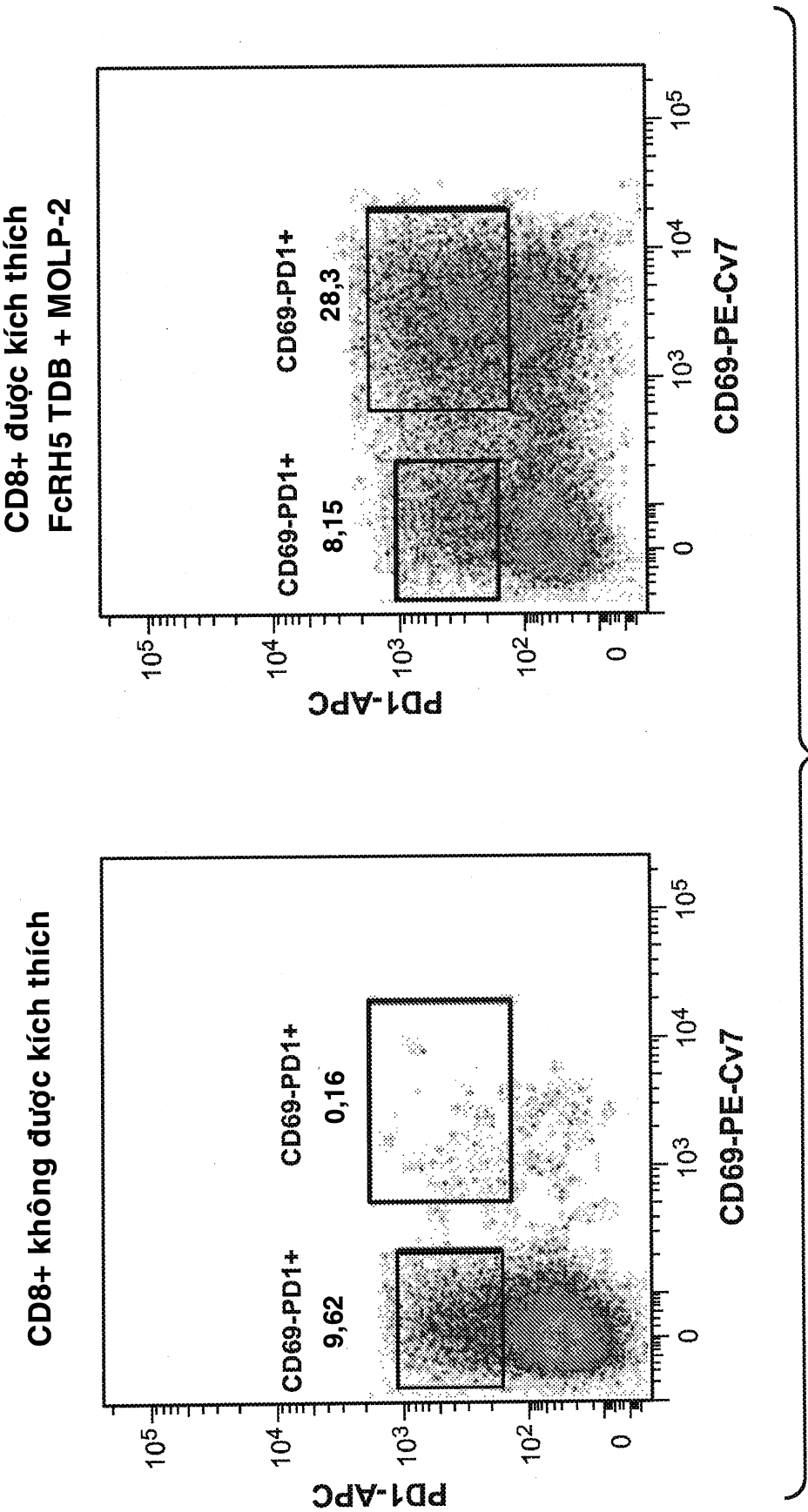

CD8+ được kích thích
FcRH5 TDB + MOLP-2
CD69-PD1+
28,3
CD69-PD1+
8,15
PD1-APC
CD69-PE-Cv7
CD8+ không được kích thích
CD69-PD1+
0,16
CD69-PD1+
9,62
PD1-APC
CD69-PE-Cv7

Fig.34

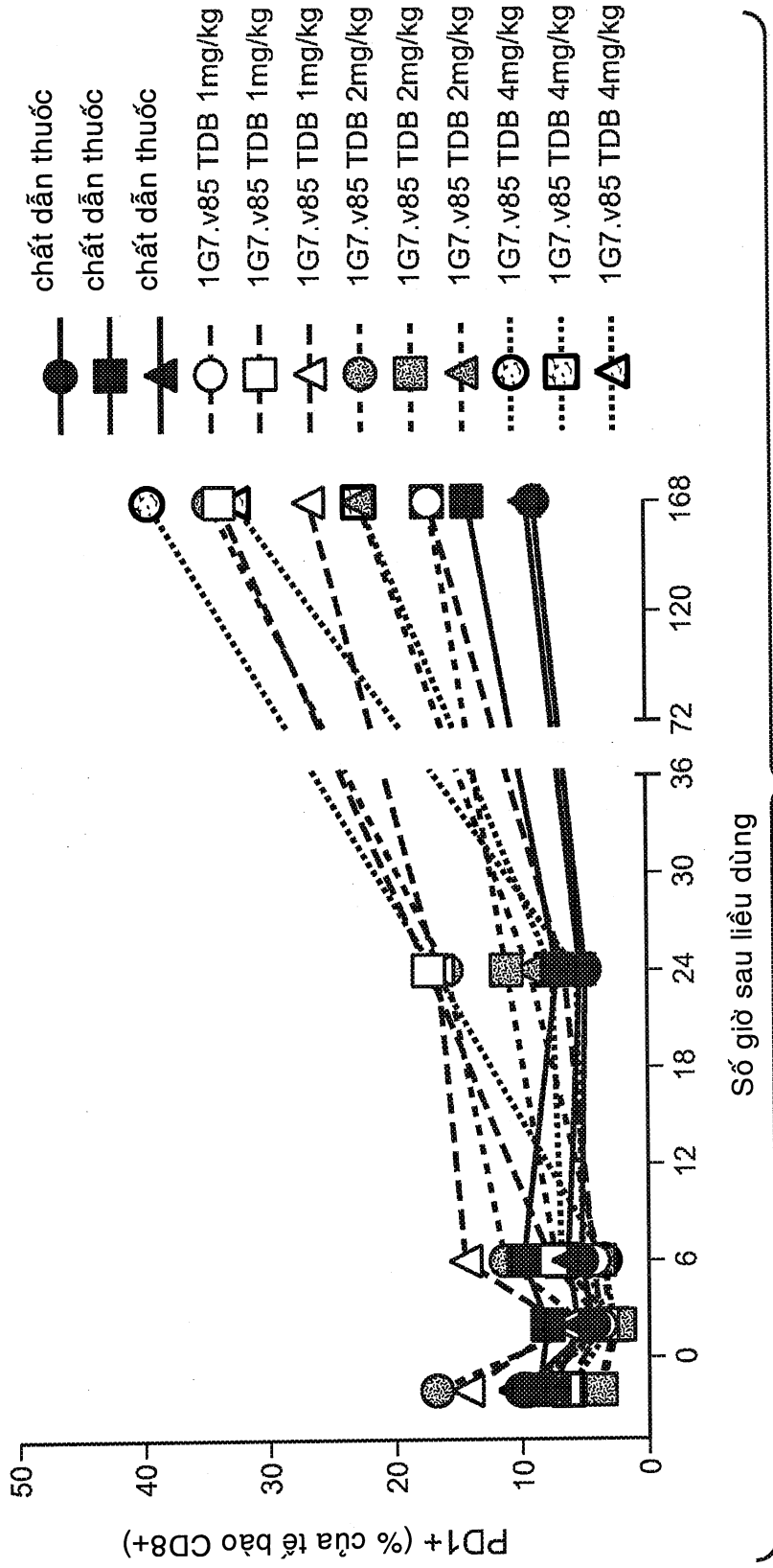

CD8+PD1+-Máu
PD1+ (% của tế bào CD8+)
0
10
20
30
40
50
0
6
12
18
24
30
36
72
120
168
Số giờ sau liều dùng
chất dẫn thuốc
chất dẫn thuốc
chất dẫn thuốc
1G7.v85 TDB 1mg/kg
1G7.v85 TDB 1mg/kg
1G7.v85 TDB 1mg/kg
1G7.v85 TDB 2mg/kg
1G7.v85 TDB 2mg/kg
1G7.v85 TDB 2mg/kg
1G7.v85 TDB 4mg/kg
1G7.v85 TDB 4mg/kg
1G7.v85 TDB 4mg/kg

Fig.35A

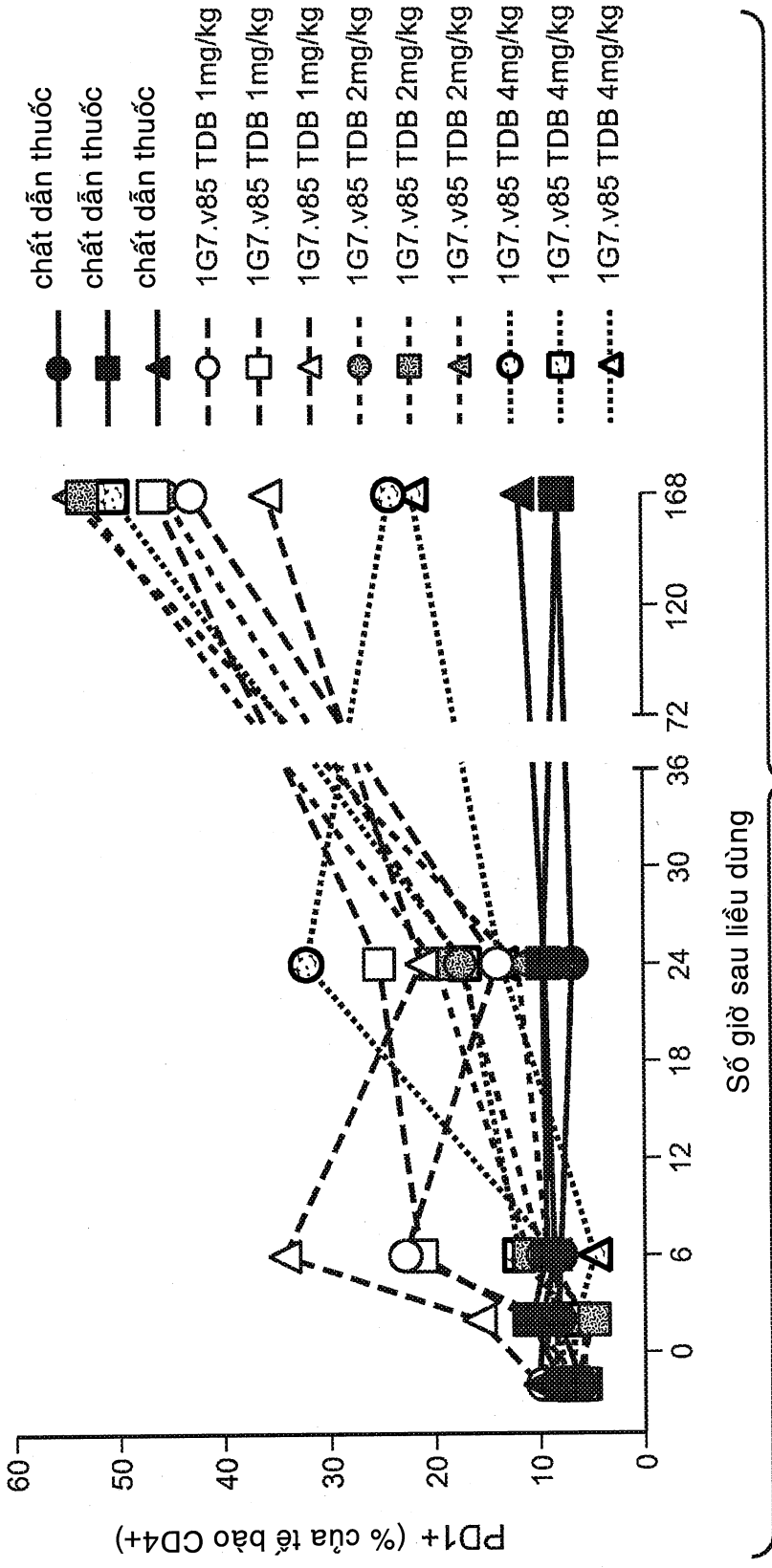

CD4+PD1+-Máu
PD1+ (% của tế bào CD4+)
0
10
20
30
40
50
60
0
6
12
18
24
30
36
72
120
168
Số giờ sau liều dùng
chất dẫn thuốc
chất dẫn thuốc
chất dẫn thuốc
1G7.v85 TDB 1mg/kg
1G7.v85 TDB 1mg/kg
1G7.v85 TDB 1mg/kg
1G7.v85 TDB 2mg/kg
1G7.v85 TDB 2mg/kg
1G7.v85 TDB 2mg/kg
1G7.v85 TDB 4mg/kg
1G7.v85 TDB 4mg/kg
1G7.v85 TDB 4mg/kg

Fig.35B

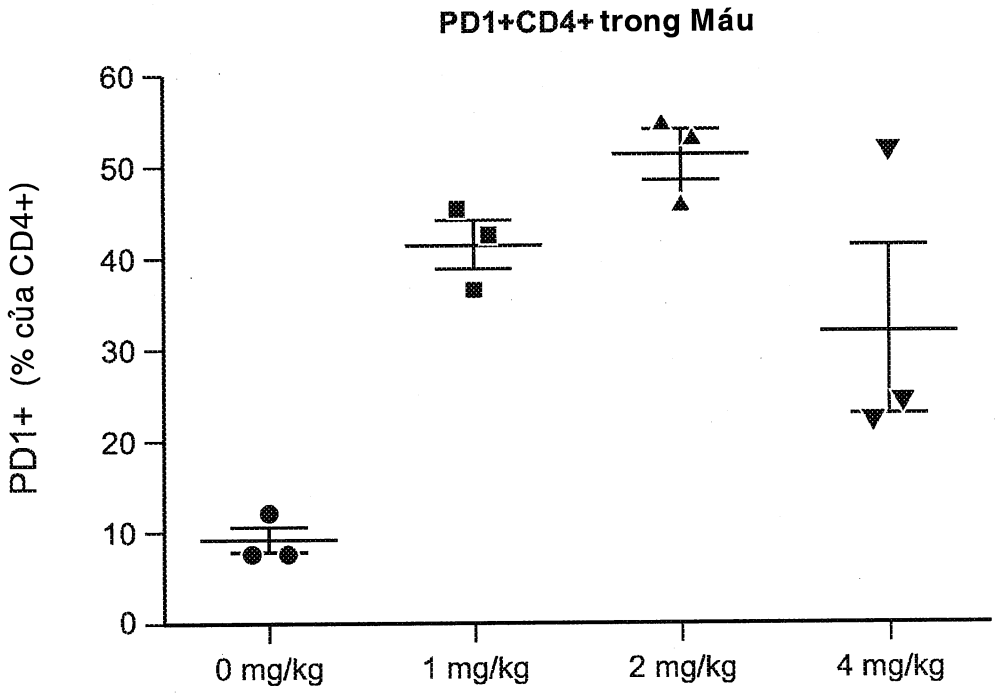


Fig.36A

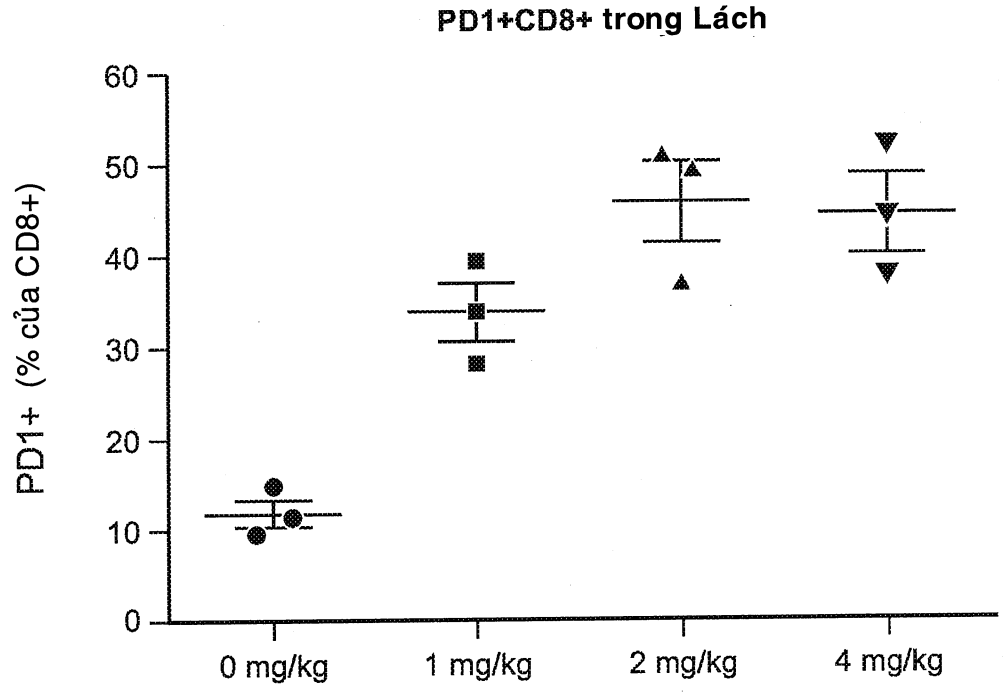


Fig.36B

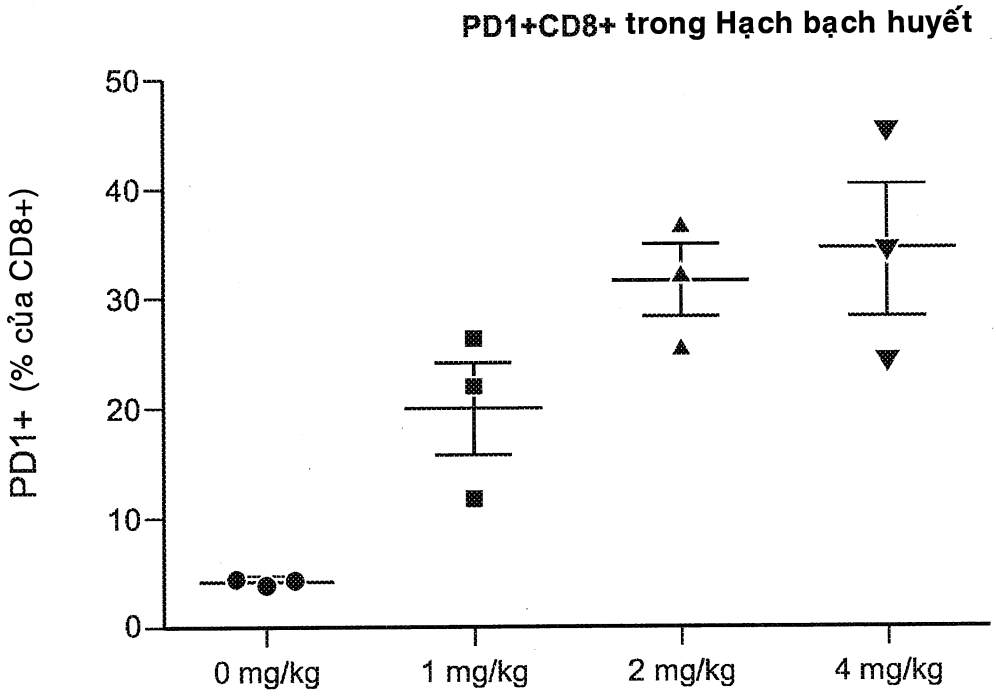


Fig.36C

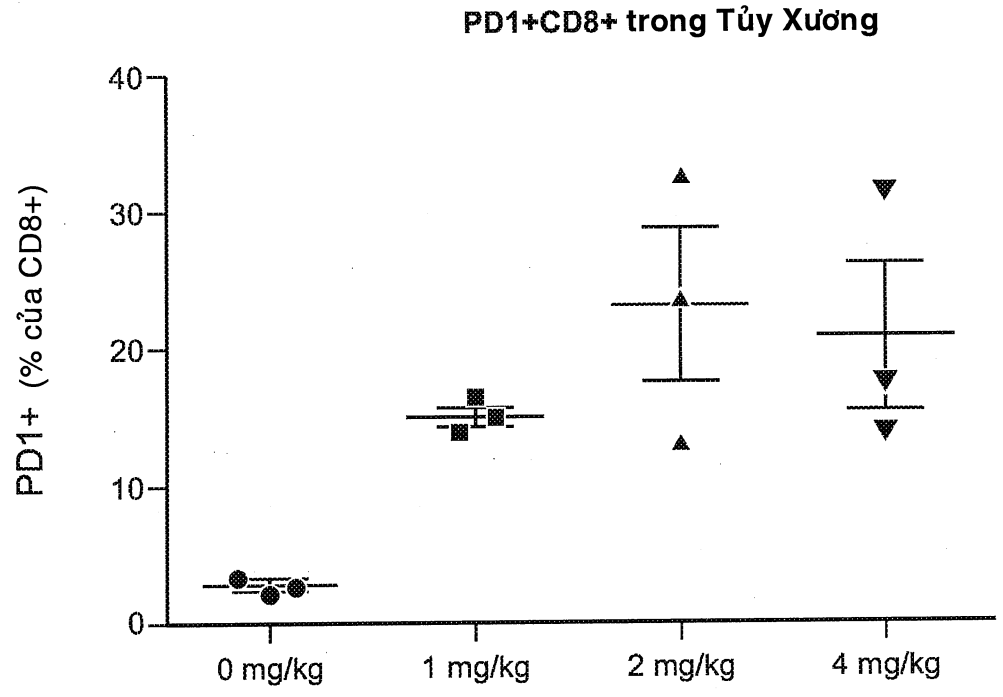


Fig.36D

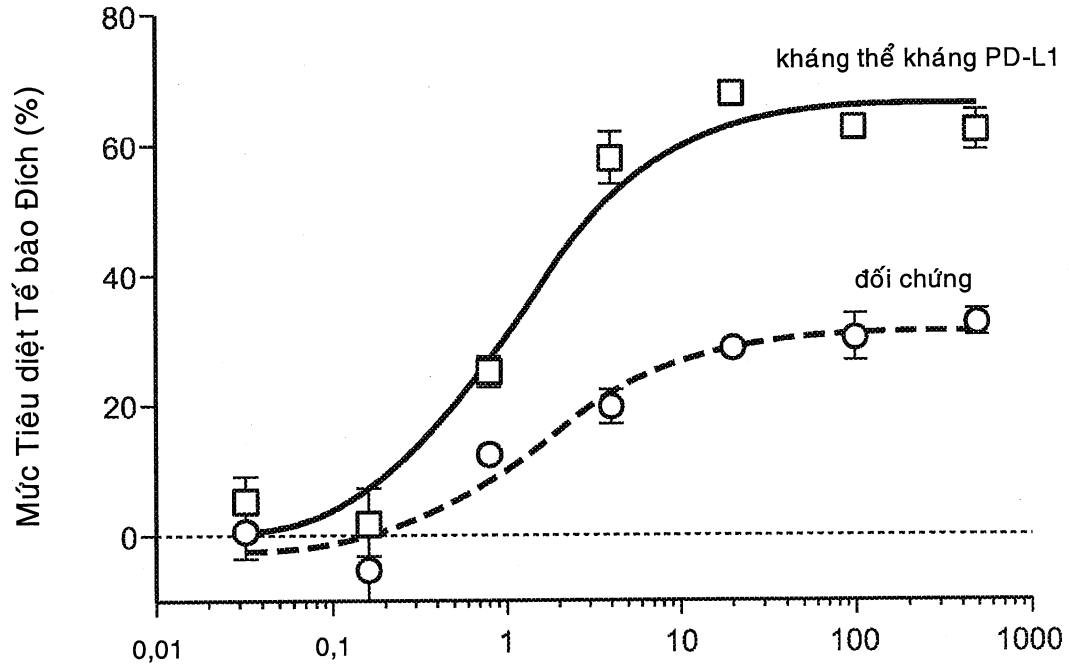


Fig.37A

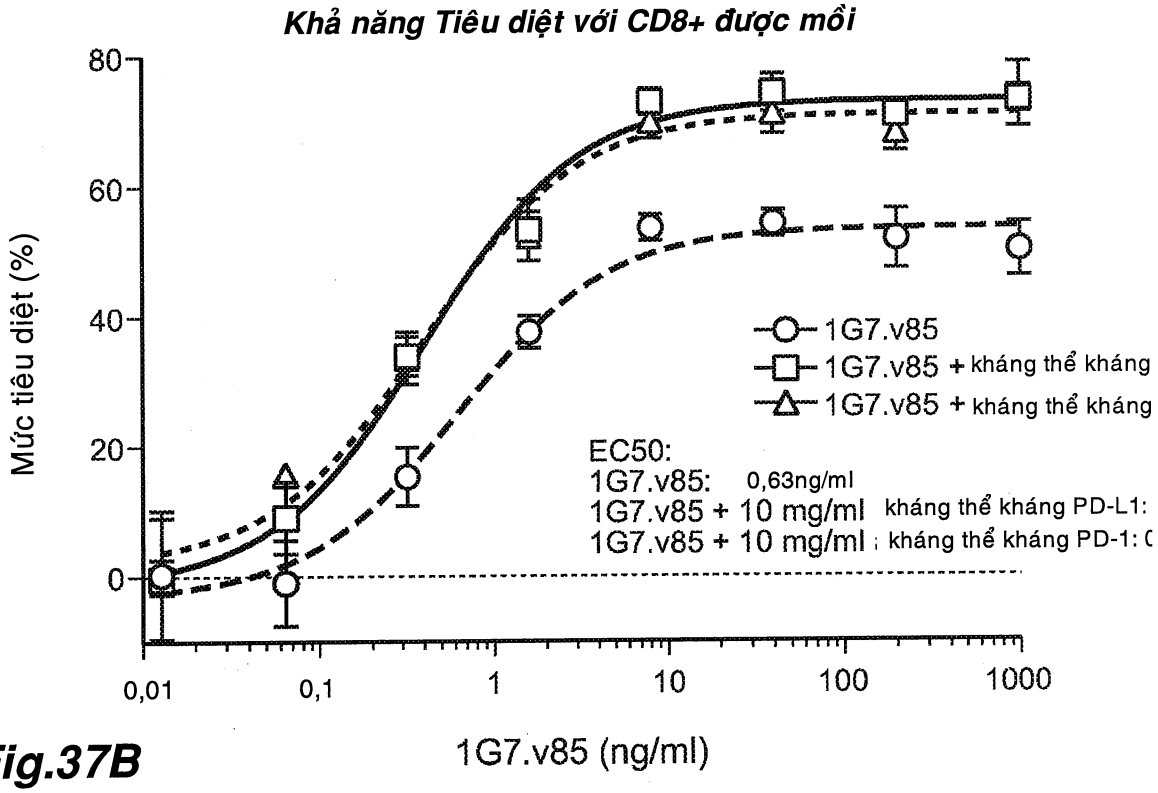


Fig.37B

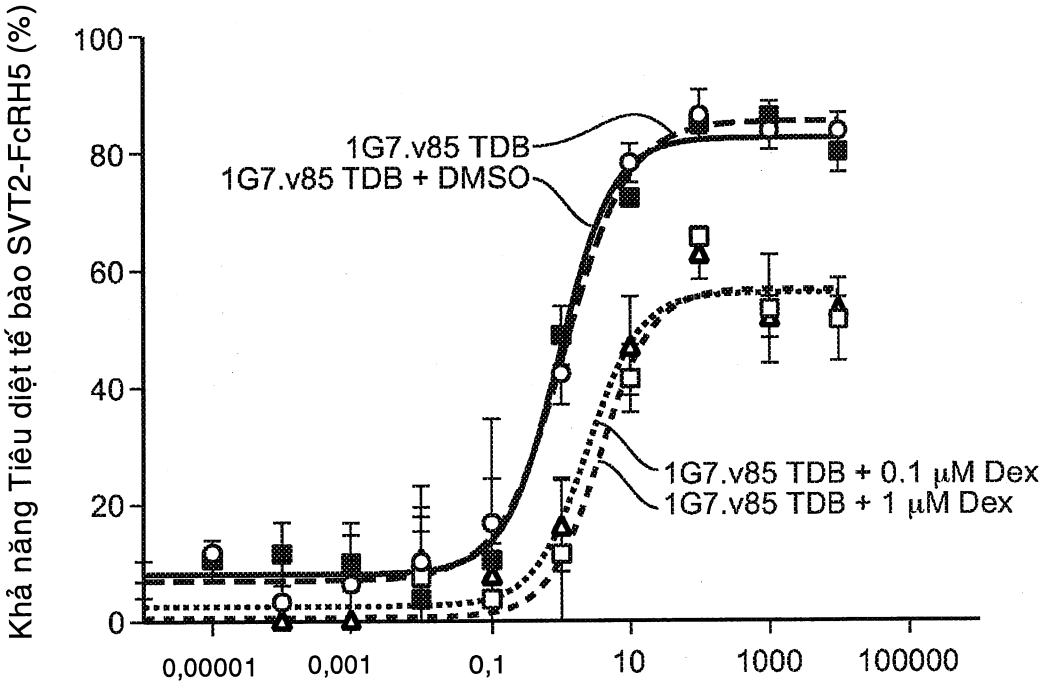

Khả năng Tiêu diệt tế bào SVT2-FcRH5 (%)
100
80
60
40
20
0
1G7.v85 TDB
1G7.v85 TDB + DMSO
1G7.v85 TDB + 0.1 μM Dex
1G7.v85 TDB + 1 μM Dex
0,00001
0,001
0,1
10
1000
100000
FcRH5 TDB (ng/ml)

Fig.38A

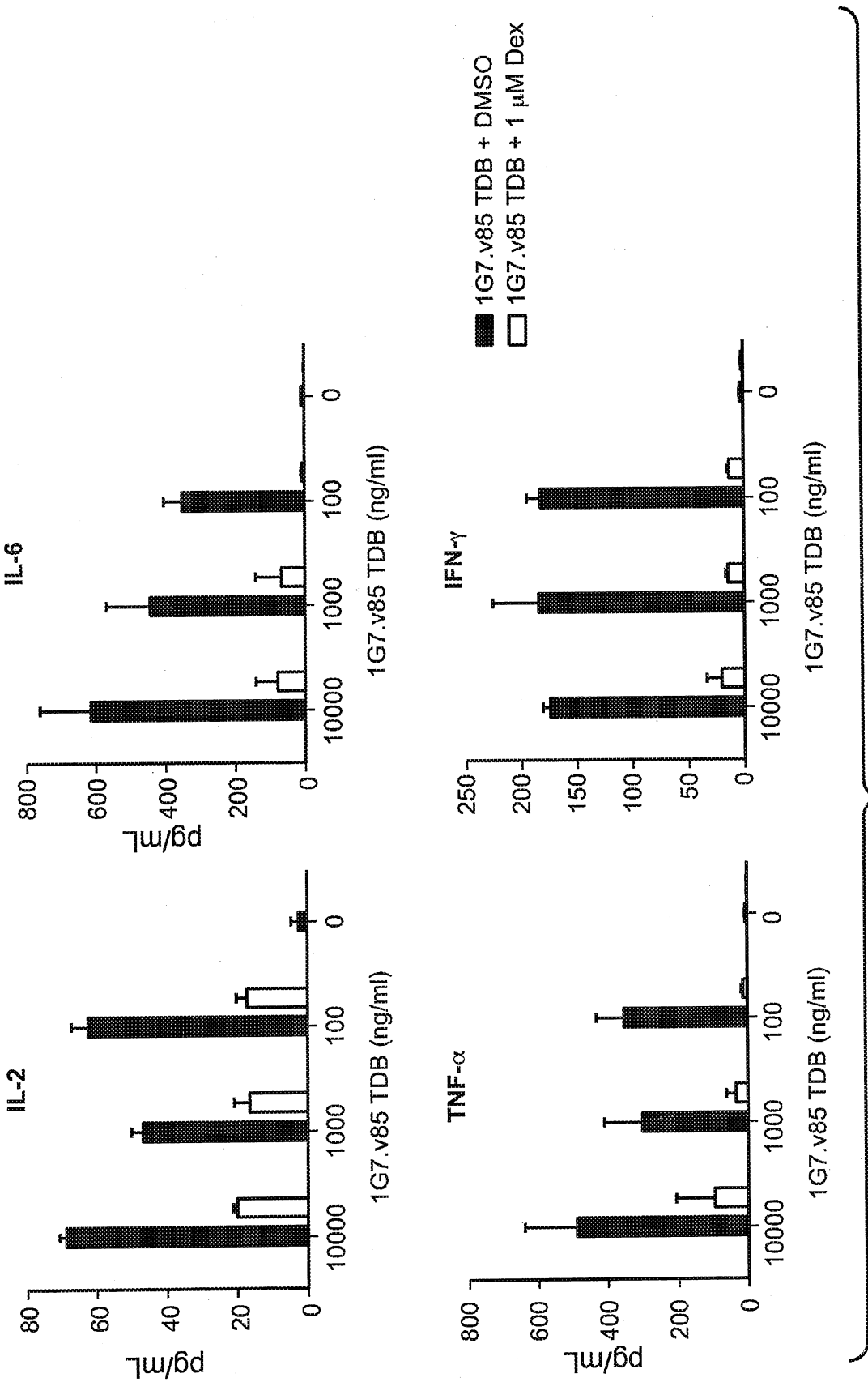

1G7.v85 TDB + DMSO
1G7.v85 TDB + 1 µM Dex
IL-6
IL-2
IFN-γ
TNF-α
pg/mL
1G7.v85 TDB (ng/ml)
0
10000
1000
100
0
200
400
600
800
20
40
60
80
50
100
150
200
250

Fig.38B

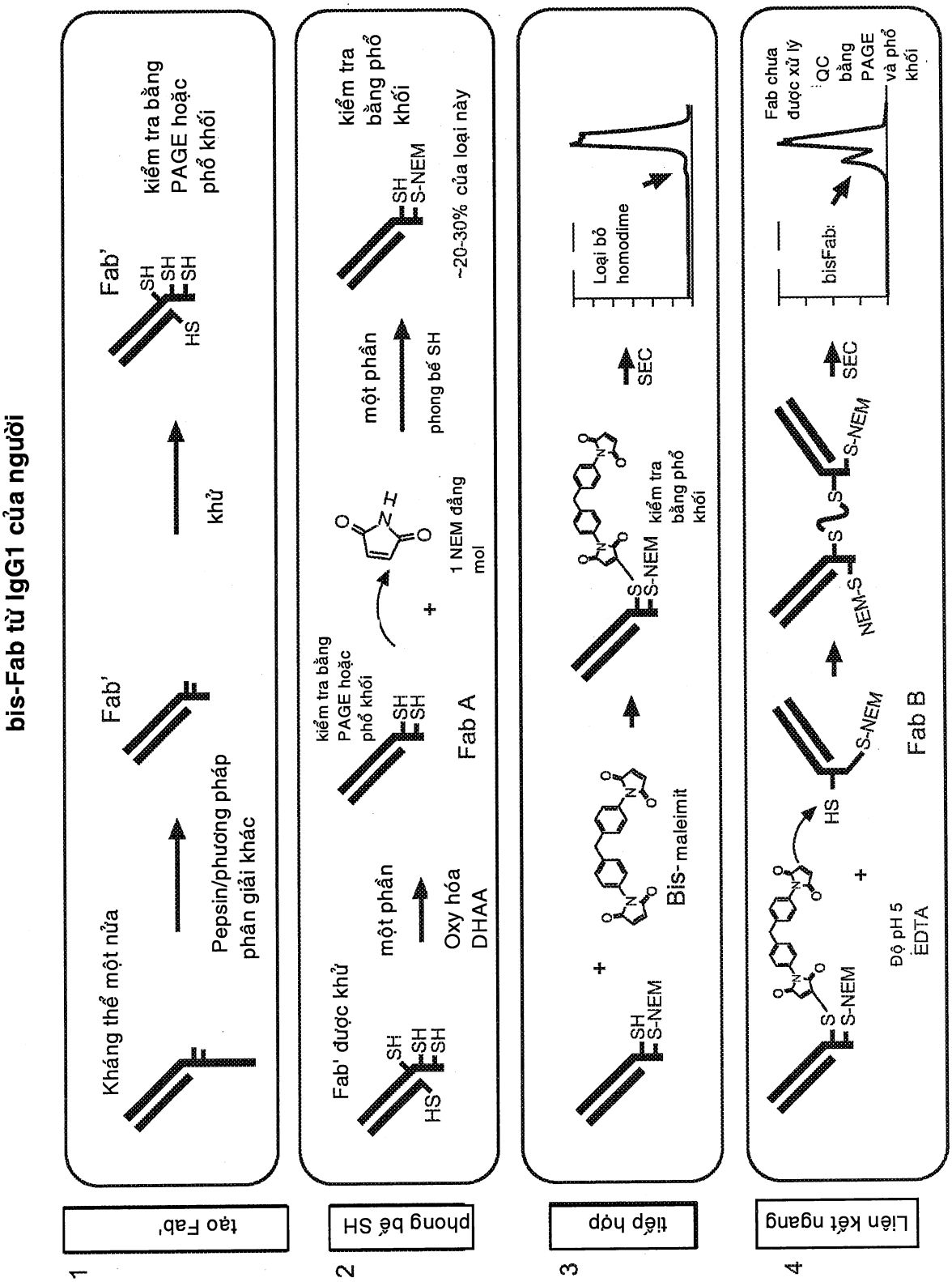

bis-Fab từ IgG1 của người
1
tạo Fab'
Kháng thể một nửa
Pepsin/phương pháp phân giải khác
Fab'
khử
Fab'
SH
SH
SH
HS
kiểm tra bằng PAGE hoặc phổ khối
2
phong bế SH
Fab' được khử
SH
SH
SH
HS
một phần
Oxy hóa DHAA
kiểm tra bằng PAGE hoặc phổ khối
SH
SH
Fab A
+
1 NEM đẳng mol
một phần
phong bế SH
SH
S-NEM
~20-30% của loại này
kiểm tra bằng phổ khối
3
tiếp hợp
SH
S-NEM
+
Bis-maleimit
S
S-NEM
kiểm tra bằng phổ khối
SEC
Loại bỏ homodime
4
Liên kết ngang
S
S-NEM
Độ pH 5
EDTA
+
HS
S-NEM
Fab B
NEM-S
S
S
S-NEM
SEC
bisFab
Fab chưa được xử lý
QC bằng PAGE và phổ khối

Fig.39

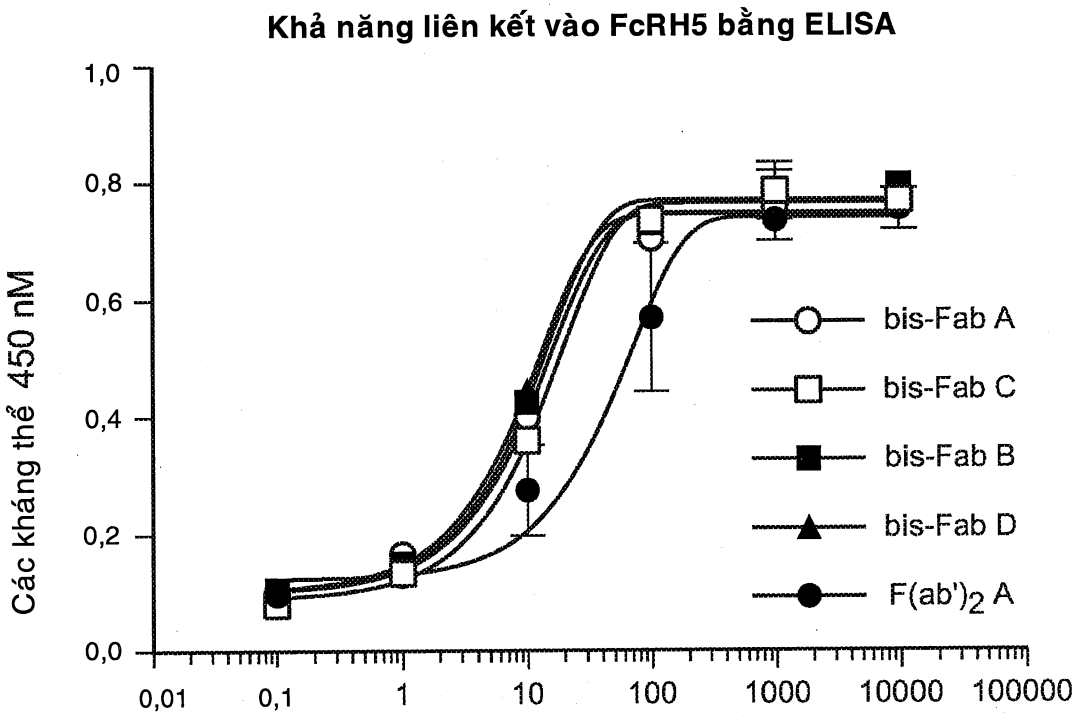


Fig.40A

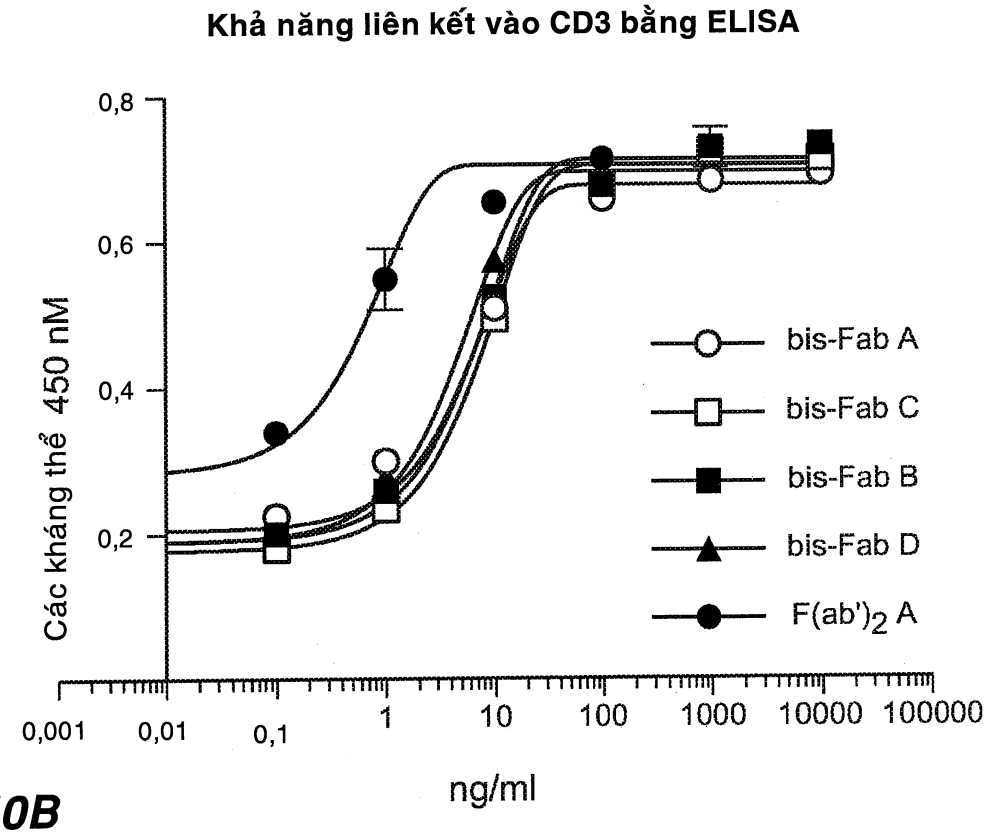


Fig.40B

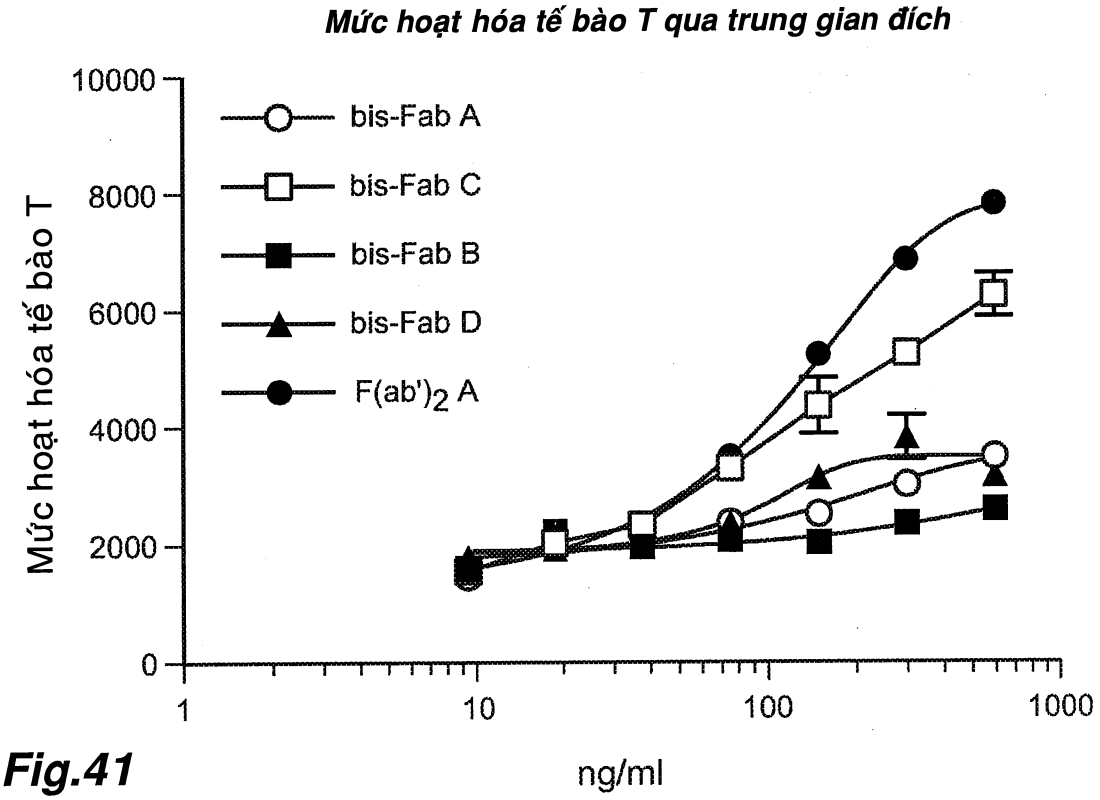

Mức hoạt hóa tế bào T qua trung gian đích
Mức hoạt hóa tế bào T
10000
8000
6000
4000
2000
0
bis-Fab A
bis-Fab C
bis-Fab B
bis-Fab D
F(ab')2 A
1
10
100
1000
ng/ml

Fig.41

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> Genentech, Inc.

<120> Kháng thể kháng FcRH5, chế phẩm và thể tiếp hợp miễn dịch chứa kháng thể này

<130> 50474-134WO2

<150> US 62/180,459
<151> 16-06-2015

<160> 215

<170> PatentIn phiên bản 3.5

<210> 1
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 1

Arg Phe Gly Val His
1 5

<210> 2
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (12)..(12)
<223> Xaa là Ala hoặc Pro

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (15)..(15)
<223> Xaa là Met, Gly, hoặc Val

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (16)..(16)

<223> Xaa là Ser, Asp, hoặc Pro

<400> 2

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Xaa Ala Phe Xaa Xaa
1 5 10 15

<210> 3
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là Ser hoặc Pro

<400> 3

His Tyr Tyr Gly Ser Xaa Asp Tyr Ala Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 4
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (7)..(7)
<223> Xaa là Ser hoặc Arg

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (9)..(9)
<223> Xaa là Ile hoặc Leu

<400> 4

Lys Ala Ser Gln Asp Val Xaa Asn Xaa Val Val
1 5 10

<210> 5
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (2)..(2)
<223> Xaa là Ala hoặc Gly

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (3)..(3)
<223> Xaa là Ser hoặc Tyr

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Tyr hoặc Asn

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (7)..(7)
<223> Xaa là Thr hoặc Ser

<400> 5

Ser Xaa Xaa Xaa Arg Tyr Xaa
1 5

<210> 6
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (3)..(3)
<223> Xaa là His hoặc Gln

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (4)..(4)
<223> Xaa là Tyr hoặc Phe

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (5)..(5)
<223> Xaa là Gln hoặc Ser

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là Ser hoặc Pro

<400> 6

Gln Gln Xaa Xaa Xaa Xaa Pro Tyr Thr
1 5

<210> 7
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 7

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 8
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 8

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Val Ser
1 5 10 15

<210> 9
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 9

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

<210> 10
<211> 12
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 10

His Tyr Tyr Gly Ser Pro Asp Tyr Ala Leu Asp Asn
1 5 10

<210> 11
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 11

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ile Val Val
1 5 10

<210> 12
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 12

Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Asn Leu Val Val
1 5 10

<210> 13
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 13

Lys Ala Ser Gln Asp Val Arg Asn Ile Val Val
1 5 10

<210> 14
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 14

Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Leu Val Val
1 5 10

<210> 15
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 15

Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 16
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 16

Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 17
<211> 7

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 17

Ser Gly Tyr Asn Arg Tyr Ser
1 5

<210> 18
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 18

Ser Gly Tyr Tyr Arg Tyr Thr
1 5

<210> 19
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 19

Ser Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ser
1 5

<210> 20
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 20

Gln Gln His Tyr Ser Ser Pro Tyr Thr
1 5

<210> 21
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 21

Gln Gln Gln Tyr Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 22
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 22

Gln Gln Gln Phe Gln Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 23
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 23

Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 24
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 24

Gln Gln Gln Tyr Gln Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 25
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 25

Gln Gln His Tyr Gln Pro Pro Tyr Thr
1 5

<210> 26
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 26

Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr Ala Met Gly
1 5 10

<210> 27
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 27

Thr Ile Gly Thr Gly Gly Thr Pro Tyr Tyr Ala Ser Trp Ala Lys Gly
1 5 10 15

<210> 28
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 28

Ala Arg Asp Met Tyr Thr Gly Ser Ile Tyr Tyr Asp Met
1 5 10

<210> 29
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 29

Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Asn Asn Ala Gln Leu Ser
1 5 10

<210> 30
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 30

Asp Thr Ser Asn Leu Ala Ser
1 5

<210> 31
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 31

Leu Gly Ala Tyr Thr Asp Asp Ala Asp Asn Ala
1 5 10

<210> 32
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 32

Gly Tyr Thr Phe Thr His Tyr Ala Met His
1 5 10

<210> 33
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 33

Met Ile Ser Ser Ser Ser Gly Asn Thr Asn Phe Asn Gln Lys Phe Met
1 5 10 15

Asp

<210> 34
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 34

Ala Arg Trp Ser Tyr Tyr Ala Leu Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 35
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 35

Ser Ala Asp Ser Ser Val Asp Tyr Ile His

1 5 10

<210> 36
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 36

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 37
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 37

Phe Gln Gly Ser Gly Tyr Pro Leu Thr
1 5

<210> 38
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 38

Gly Tyr Thr Phe Thr Asn Tyr Val Ile His
1 5 10

<210> 39
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 39

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

Gly

<210> 40
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 40

Ala Arg Arg Asp Tyr Tyr Gly Ser Ser Asp Tyr
1 5 10

<210> 41
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 41

Ser Ala Ser Ser Ser Val Asp Tyr Met His
1 5 10

<210> 42
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 42

Asp Thr Ser Lys Leu Ala Ser
1 5

<210> 43

<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 43

Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
1 5

<210> 44
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (1)..(1)
<223> Xaa là Glu, Ser, hoặc Phe

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (28)..(28)
<223> Xaa là Ser hoặc Pro

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (29)..(29)
<223> Xaa là Leu hoặc Thr

<400> 44

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Xaa Xaa Thr
20 25 30

<210> 45
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>

<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (2)..(2)
<223> Xaa là Val hoặc Tyr

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (13)..(13)
<223> Xaa là Leu hoặc Ile

<400> 45

Trp Xaa Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Xaa Gly
1 5 10

<210> 46
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 46

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Asn
20 25 30

<210> 47
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 47

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 48
<211> 23

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 48

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 49
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (9)..(9)
<223> Xaa là Ala hoặc Ser

<400> 49

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Xaa Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 50
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 50

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 51
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 51

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 52
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 52

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

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

<210> 53
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 53

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

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

<210> 54
<211> 14

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 54

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 55
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 55

Trp Val Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 56
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 56

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 57
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 57

Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 58
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 58

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser
20 25

<210> 59
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 59

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 60
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 60

Arg Phe Thr Ile Ser Lys Asp Ser Ser Lys Asn Thr Val Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Phe Cys
20 25 30

<210> 61
<211> 11

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 61

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 62
<211> 22
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 62

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr
20

<210> 63
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 63

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 64
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 64

Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 65
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 65

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 66
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 66

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

Ser Val Lys Ile Ser Cys Lys Gly Ser
20 25

<210> 67
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 67

Trp Val Lys Gln Ser His Thr Lys Ser Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 68
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 68

Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr Leu Glu
1 5 10 15

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

<210> 69
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 69

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 70
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 70

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20

<210> 71

<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 71

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Asn Thr Ser Pro Lys Leu Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 72
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 72

Gly Val Pro Gly Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 73
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 73

Phe Gly Ser Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 74
<211> 25
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 74

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

Ser Val Lys Met Ser Cys Lys Ala Ser
20 25

<210> 75
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 75

Trp Met Lys Gln Lys Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 76
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 76

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

Leu Ser Ser Leu Thr Ser Glu Asp Ser Ala Val Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 77
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 77

Trp Gly Gln Gly Thr Thr Leu Thr Val Ser Ser

1 5 10

<210> 78
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 78

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys
20

<210> 79
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 79

Trp Tyr Gln Gln Lys Ser Gly Thr Ser Pro Lys Lys Trp Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 80
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 80

Gly Val Pro Ala Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser
1 5 10 15

Leu Thr Ile Gly Ser Met Glu Ala Glu Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 81
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 81

Phe Gly Gly Gly Thr Lys Leu Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 82
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 82

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser

115 120

<210> 83
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 83

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 84
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 84

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

```
Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Ser Leu Thr Arg Phe
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
                85                  90                  95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 85
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 85

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

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
```

50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 86
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 86

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 87
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 87

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

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

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

Tyr Ser Gly Tyr Asn Arg Tyr 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 Gln Phe Gln Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 88
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 88

Glu Val Gln Leu Val Glu Ser Gly Pro Gly Leu Val Lys Pro Ser Glu

1 5 10 15

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 89
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 89

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

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 90
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 90

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 91
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 91

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

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 92
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 92

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
                85                  90                  95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 93
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 93

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

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

Val Val Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

Tyr Ser Gly Tyr Tyr Arg Tyr Thr 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 Gln Phe Gln Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 94
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 94

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 95
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 95

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

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

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

Tyr Ser Gly Tyr Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Gln Tyr Gln Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 96
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 96

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
                85                  90                  95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 97
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 97

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

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

Val Val Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45
```

Tyr Ser Gly Tyr Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Gln Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 98
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 98

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

Asn His Tyr Tyr Gly Ser Ser Asp Tyr Ala Leu Asp Asn Trp Gly Gln

100 105 110

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 99
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 99

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

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

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

Tyr Ser Gly Tyr Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Gln Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 100
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 100

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 101
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 101

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

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

Val Val Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile

35 40 45

Tyr Ser Gly Tyr Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Gln Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 102
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 102

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

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

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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


Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  103
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo

<220>
<223>  Cấu trúc tổng hợp

<400>  103

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


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


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


Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
                85                  90                  95


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


<210>  104
<211>  120
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo

<220>
<223>  Cấu trúc tổng hợp
```

<400> 104

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

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

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 105
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 105

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

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 106
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 106

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

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

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

```
Asn His Tyr Tyr Gly Ser Pro Asp Tyr Ala Leu Asp Asn Trp Gly Gln
            100                 105                 110


Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120


<210>  107
<211>  107
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo

<220>
<223>  Cấu trúc tổng hợp

<400>  107

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


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


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


Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60


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


Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
                85                  90                  95


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


<210>  108
<211>  119
<212>  PRT
<213>  Trình tự Nhân tạo

<220>
```

<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 108

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

Ser Leu Arg Leu Ser Cys Ala Val Ser Gly Ile Asp Leu Ser Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Arg Asp Met Tyr Thr Gly Ser Ile Tyr Tyr Asp Met Trp Gly Gln Gly
100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 109
<211> 111
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 109

Asp Ala 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 Gln Ser Ser Gln Ser Val Phe Asn Asn
20 25 30

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

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

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

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

Asp Ala Asp Asn Ala Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 110
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 110

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

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

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

Gly Met Ile Ser Ser Ser Ser Gly Asn Thr Asn Phe Asn Gln Lys Phe
50 55 60

Met Asp Lys Ala Thr Met Thr Val Asp Lys Ser Ser Thr Thr Ala Tyr
65 70 75 80

Leu Glu Leu Ala Arg Leu Thr Phe Gly Asp Ser Ala Ile Tyr Tyr Cys
85 90 95

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

Thr Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 111
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 111

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

Glu Lys Val Thr Met Thr Cys Ser Ala Asp Ser Ser Val Asp Tyr Ile
20 25 30

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

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

Gly Ser Gly Asn Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Ser Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

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

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

<210> 112
<211> 118
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 112

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

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

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

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

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

Thr Leu Thr Val Ser Ser
115

<210> 113
<211> 106
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 113

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

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

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

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

Gly Ser Gly Thr Ser Tyr Ser Leu Thr Ile Gly Ser Met Glu Ala Glu
65 70 75 80

Asp Ala Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Trp Ser Ser Asn Pro Pro Thr
85 90 95

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

<210> 114
<211> 977
<212> PRT
<213> Người khôn ngoan

<400> 114

Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
1 5 10 15

Phe Ala Arg Thr Pro Arg Pro Ile Ile Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr
20 25 30

Thr Val Phe Gln Gly Glu Arg Val Thr Leu Thr Cys Lys Gly Phe Arg
35 40 45

Phe Tyr Ser Pro Gln Lys Thr Lys Trp Tyr His Arg Tyr Leu Gly Lys
50 55 60

Glu Ile Leu Arg Glu Thr Pro Asp Asn Ile Leu Glu Val Gln Glu Ser
65 70 75 80

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

```
His Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser
            100                 105                 110

Val Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu
        115                 120                 125

Val Thr Leu Asn Asn Thr Ile Tyr Lys Asn Asp Asn Val Leu Ala Phe
    130                 135                 140

Leu Asn Lys Arg Thr Asp Phe His Ile Pro His Ala Cys Leu Lys Asp
145                 150                 155                 160

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

Ser Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Pro Phe Thr Arg Pro
            180                 185                 190

Val Leu Arg Ala Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Asn Pro Val Thr
        195                 200                 205

Leu Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu
    210                 215                 220

Arg Phe Arg Phe Phe Arg Asp Asp Gln Thr Leu Gly Leu Gly Trp Ser
225                 230                 235                 240

Leu Ser Pro Asn Phe Gln Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly
                245                 250                 255

Phe Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Pro Tyr Ser Val Ile Ser Asp
            260                 265                 270

Ser Pro Arg Ser Trp Ile Gln Val Gln Ile Pro Ala Ser His Pro Val
        275                 280                 285

Leu Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val
    290                 295                 300

Thr Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Arg
```

305 310 315 320

Phe Tyr His Glu Gly Val Pro Leu Arg His Lys Ser Val Arg Cys Glu
325 330 335

Arg Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu Asn Ser Gly Asn
340 345 350

Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Lys Pro Ser Lys Ala
355 360 365

Val Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Asn Leu
370 375 380

Ser Ser Pro Glu Asp Leu Ile Phe Glu Gly Ala Lys Val Thr Leu His
385 390 395 400

Cys Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Leu Tyr Gln Phe His His
405 410 415

Glu Gly Ala Ala Leu Glu Arg Arg Ser Ala Asn Ser Ala Gly Gly Val
420 425 430

Ala Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys
435 440 445

Thr Ala Asp Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Lys Ala Val Ser Leu
450 455 460

Ser Val Thr Val Pro Val Ser His Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala
465 470 475 480

Glu Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu His Cys Glu Val
485 490 495

Gln Arg Gly Ser Pro Gln Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Met
500 505 510

Pro Leu Trp Ser Ser Ser Thr Pro Ser Val Gly Arg Val Ser Phe Ser
515 520 525

Phe Ser Leu Thr Glu Gly His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp
530 535 540

Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Val Val Ser Leu Phe Val Thr
545 550 555 560

Val Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln
565 570 575

Ala Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Pro Arg Gly
580 585 590

Ser Pro Pro Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly
595 600 605

Ser Ser Ser Ala Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu
610 615 620

Thr Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu
625 630 635 640

Val Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val
645 650 655

Ser Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val
660 665 670

Gly Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro
675 680 685

Ile Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser
690 695 700

Ala Pro Ser Gly Gly Gly Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu
705 710 715 720

His Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Glu Ala Gln
725 730 735

```
Arg Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro
            740                 745                 750

Val Leu Thr Leu Arg Ala Pro Gly Thr His Ala Ala Val Gly Asp Leu
        755                 760                 765

Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr
    770                 775                 780

Arg Phe Phe His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Arg Ser Ser Pro Ser
785                 790                 795                 800

Gly Gly Ala Ser Leu Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Ser Gly Asn
                805                 810                 815

Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr
            820                 825                 830

Val Thr Leu Tyr Ile Thr Gly Leu Thr Ala Asn Arg Ser Gly Pro Phe
        835                 840                 845

Ala Thr Gly Val Ala Gly Gly Leu Leu Ser Ile Ala Gly Leu Ala Ala
    850                 855                 860

Gly Ala Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Lys
865                 870                 875                 880

Pro Ala Ser Asp Pro Ala Arg Ser Pro Ser Asp Ser Asp Ser Gln Glu
                885                 890                 895

Pro Thr Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr
            900                 905                 910

Thr Asn Ala Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg
        915                 920                 925

Ile Ile Gln Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asp Pro Arg His
    930                 935                 940
```

Leu Arg Asn Lys Gly Ser Pro Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala
945 950 955 960

Ser Thr Pro Val Ser Gly Ser Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His
965 970 975

Arg

<210> 115
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 115

Ser Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 116
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 116

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

Asp

<210> 117
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (6)..(6)
<223> Xaa là Tyr hoặc Ala

<400> 117

Asp Gly Tyr Ser Arg Xaa Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 118
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 118

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 119
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 119

Trp Thr Ser Thr Arg Lys Ser
1 5

<210> 120
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>

<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (1)..(1)
<223> Xaa là Lys hoặc Thr

<400> 120

Xaa Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
1 5

<210> 121
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 121

Asp Gly Tyr Ser Arg Tyr Tyr Phe Asp Tyr
1 5 10

<210> 122
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 122

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

<210> 123
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 123

Lys Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
1 5

<210> 124

<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 124

Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
1 5

<210> 125
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 125

Glu 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 Phe Thr Phe Thr
20 25 30

<210> 126
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 126

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 127
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 127

Arg Val Thr Ile Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 128
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 128

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 129
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 129

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 130
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 130

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr

1 5 10 15

<210> 131
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 131

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 132
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 132

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 133
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 133

Glu 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 Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 134
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 134

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

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

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

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

```
Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
                85                  90                  95

Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
            100                 105                 110
```

<210> 135
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 135

```
Glu 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 Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
            20                  25                  30

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115
```

<210> 136
<211> 112

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 136

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

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

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

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

Ile Ser Ser Leu Gln Ala Glu Asp Val Ala Val Tyr Tyr Cys Lys Gln
85 90 95

Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 137
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 137

Glu 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 Phe Thr Phe Thr Ser Tyr
20 25 30

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 138
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 138

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

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

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

Ser Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Thr Ser Thr Arg Lys Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 139
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 139

Asn Tyr Tyr Ile His
1 5

<210> 140
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 140

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

Gly

<210> 141
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 141

Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr

1 5 10

<210> 142
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 142

Lys Ser Ser Gln Ser Leu Leu Asn Ser Arg Thr Arg Lys Asn Tyr Leu
1 5 10 15

Ala

<210> 143
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 143

Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser
1 5

<210> 144
<211> 8
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 144

Thr Gln Ser Phe Ile Leu Arg Thr
1 5

<210> 145
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 145

Glu 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
20 25 30

<210> 146
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 146

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Ile Gly
1 5 10

<210> 147
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 147

Arg Ala Thr Leu Thr Ala Asp Thr Ser Thr Ser Thr Ala Tyr Leu Glu
1 5 10 15

Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg
20 25 30

<210> 148
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 148

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 149
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 149

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

Glu Arg Ala Thr Ile Asn Cys
20

<210> 150
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 150

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Gln Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 151
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 151

Gly Val Pro Asp Arg Phe Ser Gly Ser Gly Ser Gly Thr Asp Phe Thr
1 5 10 15

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

<210> 152
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 152

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
1 5 10

<210> 153
<211> 119
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 153

Glu 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 Asn Tyr
20 25 30

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

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

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

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

Ala Arg Asp Ser Tyr Ser Asn Tyr Tyr Phe Asp Tyr Trp Gly Gln Gly

100 105 110

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 154
<211> 112
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 154

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

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

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

Pro Pro Lys Leu Leu Ile Tyr Trp Ala Ser Thr Arg Glu Ser Gly Val
50 55 60

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

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

Ser Phe Ile Leu Arg Thr Phe Gly Gln Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
100 105 110

<210> 155
<211> 5
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 155

Gly Tyr Thr Met Asn
1 5

<210> 156
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (9)..(9)
<223> Xaa là Ser hoặc Thr

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (12)..(12)
<223> Xaa là Asn hoặc Ala

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (13)..(13)
<223> Xaa là Gln hoặc Asp

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (14)..(14)
<223> Xaa là Lys hoặc Ser

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (15)..(15)
<223> Xaa là Val hoặc Phe

<220>
<221> ĐẶC TÍNH HỖN TẠP
<222> (17)..(17)
<223> Xaa là Gly hoặc Asp

<400> 156

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Xaa Thr Tyr Xaa Xaa Xaa Xaa Lys
1 5 10 15

Xaa

<210> 157
<211> 13
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 157

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

<210> 158
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 158

Arg Ala Ser Gln Asp Ile Arg Asn Tyr Leu Asn
1 5 10

<210> 159
<211> 7
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 159

Tyr Thr Ser Arg Leu Glu Ser
1 5

<210> 160
<211> 9
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 160

Gln Gln Gly Asn Thr Leu Pro Trp Thr
1 5

<210> 161
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 161

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Thr Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 162
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 162

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe Lys
1 5 10 15

Asp

<210> 163
<211> 17
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 163

Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Ala Asp Ser Val Lys
1 5 10 15

Gly

<210> 164
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 164

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

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

<210> 165
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 165

Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Lys Asp Leu Glu Trp Val Ala
1 5 10

<210> 166
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 166

Arg Phe Thr Ile Ser Val Asp Lys Ser Lys Asn Thr Ala Tyr Leu Gln
1 5 10 15

Met Asn Ser Leu Arg Ala Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ala Arg

20 25 30

<210> 167
<211> 11
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 167

Trp Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
1 5 10

<210> 168
<211> 23
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 168

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys
20

<210> 169
<211> 15
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 169

Trp Tyr Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ala Pro Lys Leu Leu Ile Tyr
1 5 10 15

<210> 170
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 170

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

Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys
20 25 30

<210> 171
<211> 10
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 171

Phe Gly Gln Gly Thr Lys Leu Glu Leu Lys
1 5 10

<210> 172
<211> 122
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 172

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

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

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

Ala Leu Ile Asn Pro Tyr Lys Gly Val Ser Thr Tyr Asn Gln Lys Phe
50 55 60

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

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

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

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 173
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 173

Asp Ile Gln Met 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 Asp Ile Arg Asn Tyr
20 25 30

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

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

Ser Gly Ser Gly Thr Asp Tyr Thr Leu Thr Ile Ser Ser Leu Gln Pro
65 70 75 80

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

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

<210> 174
<211> 28
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 174

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

Val Ser Ile Ser Gly Thr Thr Val Ile Leu Thr Cys
20 25

<210> 175
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 175

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Pro Ala Phe Met Ser
1 5 10 15

<210> 176
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 176

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Gly Ser
1 5 10 15

<210> 177
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 177

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Asp
1 5 10 15

<210> 178
<211> 16
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 178

Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met Pro
1 5 10 15

<210> 179
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 179

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

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

<210> 180
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 180

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

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

<210> 181
<211> 30
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 181

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Thr
20 25 30

<210> 182
<211> 14
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 182

Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu Gly
1 5 10

<210> 183
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 183

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Met
1 5 10 15

Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Asn

20 25 30

<210> 184
<211> 32
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 184

Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu Lys
1 5 10 15

Leu Ser Asp Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser Asn
20 25 30

<210> 185
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 185

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 186
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 186

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 187
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 187

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 188
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 188

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

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

```
Val Val Trp Phe Gln Gln Lys Pro Gly Lys Ser Pro Lys Leu Leu Ile
        35                  40                  45

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 189
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 189

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

Thr Leu Ser Leu Thr Cys Thr Val Ser Gly Phe Pro Leu Thr Arg Phe
            20                  25                  30

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
    50                  55                  60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65                  70                  75                  80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
```

85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 190
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 190

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 191
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 191

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 192
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 192

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

Asp Arg Val Thr Ile Thr Cys Lys Ala Ser Gln Asp Val Ser Asn Ile

20 25 30

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 193
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 193

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

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

Gly Val His Trp Tyr Arg Gln Pro Pro Gly Lys Gly Leu Glu Trp Leu
35 40 45

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 194
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 194

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 195
<211> 120
<212> PRT

<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 195

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

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

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 196
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 196

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 197
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 197

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

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

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

```
Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
                85                  90                  95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
        115                 120
```

<210> 198
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 198

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 199
<211> 120

<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 199

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Asp Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 200
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 200

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 201
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 201

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
    50                  55                  60

Pro Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65                  70                  75                  80
```

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 202
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 202

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 203

<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 203

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

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

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 204
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 204

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 205
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 205

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu

65 70 75 80

Lys Leu Ser Asp Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 206
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 206

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

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 207
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 207

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Met
50 55 60

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 208
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 208

Asp Ile Gln Met Thr Gln Ser Pro Ser Ser Leu Ser Ala Ser Val Gly

1 5 10 15

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

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

Tyr Ser Ala Ser Tyr Arg Tyr Thr 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 His Tyr Ser Ser Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 209
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 209

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

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

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 210
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 210

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

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 211
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 211

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

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

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

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

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 212
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 212

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

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
    50                  55                  60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
                85                  90                  95

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

<210> 213
<211> 120
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 213

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

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

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

Gly Val Ile Trp Arg Gly Gly Ser Thr Asp Tyr Asn Ala Ala Phe Val
    50                  55                  60
```

Ser Arg Leu Thr Ile Ser Lys Asp Asn Ser Lys Asn Gln Val Ser Leu
65 70 75 80

Lys Leu Ser Ser Val Thr Ala Ala Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys Ser
85 90 95

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

Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115 120

<210> 214
<211> 107
<212> PRT
<213> Trình tự Nhân tạo

<220>
<223> Cấu trúc tổng hợp

<400> 214

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

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

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

Tyr Ser Gly Ser Tyr Arg Tyr Ser Gly Val Pro Ser Arg Phe Ser Gly
50 55 60

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln His Tyr Ser Pro Pro Tyr
85 90 95

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

<210> 215
<211> 975
<212> PRT
<213> Khỉ đuôi dài

<400> 215

Met Leu Leu Trp Val Ile Leu Leu Val Leu Ala Pro Val Ser Gly Gln
1 5 10 15

Phe Val Arg Thr Tyr Lys Ser His Phe Leu Gln Pro Pro Trp Thr Thr
20 25 30

Val Phe Arg Gly Glu Arg Val Asn Leu Thr Cys Lys Gly Phe Gly Phe
35 40 45

Tyr Ser Ser Gln Lys Thr Lys Trp Tyr Tyr Arg His Leu Gly Lys Glu
50 55 60

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

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

Leu Asp Phe Ser Ser Ala Ser Leu Ile Leu Gln Ala Pro Leu Ser Val
100 105 110

Phe Glu Gly Asp Ser Val Val Leu Arg Cys Arg Ala Lys Ala Glu Val
115 120 125

Thr Leu Lys Thr Thr Ile Tyr Lys Asn Glu Asn Val Leu Ala Phe Leu
130 135 140

Asn Lys Ser Thr Asp Phe His Ile Ser His Ala Ser Leu Lys Asp Asn
145 150 155 160

Gly Ala Tyr Arg Cys Thr Gly Tyr Lys Glu Thr Cys Cys Leu Val Ser
165 170 175

```
Ser Asn Thr Val Lys Ile Gln Val Gln Glu Ser Phe Thr Arg Pro Val
            180                 185                 190

Leu Arg Val Ser Ser Phe Gln Pro Ile Ser Gly Ser Pro Val Thr Leu
        195                 200                 205

Thr Cys Glu Thr Gln Leu Ser Leu Glu Arg Ser Asp Val Pro Leu Gln
    210                 215                 220

Phe Cys Phe Phe Arg Asn Asp Gln Met Leu Gly Ser Gly Cys Ser Leu
225                 230                 235                 240

Ser Pro Lys Phe Arg Ile Thr Ala Met Trp Ser Lys Asp Ser Gly Ser
                245                 250                 255

Tyr Trp Cys Lys Ala Ala Thr Met Cys Tyr Asp Thr Thr Ser Asn Ser
            260                 265                 270

Leu Arg Ser Trp Ile Gln Val Leu Ile Pro Ala Ser His Pro Val Leu
        275                 280                 285

Thr Leu Ser Pro Glu Lys Ala Leu Asn Phe Glu Gly Thr Lys Val Lys
    290                 295                 300

Leu His Cys Glu Thr Gln Glu Asp Ser Leu Arg Thr Leu Tyr Lys Phe
305                 310                 315                 320

Tyr His Asp Gly Val Pro Leu Arg Tyr Lys Ser Val Arg Cys Glu Lys
                325                 330                 335

Gly Ala Ser Ile Ser Phe Ser Leu Thr Thr Glu His Ser Gly Asn Tyr
            340                 345                 350

Tyr Cys Thr Ala Asp Asn Gly His Gly Ala Lys Pro Ser Glu Ala Val
        355                 360                 365

Ser Leu Ser Val Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu Ser
    370                 375                 380

Ser Ala Glu Asp Leu Ile Ser Glu Gly Ala Lys Leu Thr Leu His Cys
```

385 390 395 400

Glu Ala Gln Arg Gly Ser Leu Pro Ile Val Tyr Gln Phe His His Glu
405 410 415

Asn Ala Ser Leu Gly Asn Arg Ser Ala His Ser Ala Gly Gly Val Ala
420 425 430

Ile Ser Phe Ser Leu Thr Ala Asp His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr
435 440 445

Ala Asn Asn Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ala Val Ser Leu Ser
450 455 460

Ile Thr Val Pro Val Ser Arg Pro Val Leu Thr Leu Ser Ser Ala Glu
465 470 475 480

Ala Leu Thr Phe Glu Gly Ala Thr Val Thr Leu Tyr Cys Glu Val Gln
485 490 495

Arg Gly Ser Pro Arg Ile Leu Tyr Gln Phe Tyr His Glu Asp Val Pro
500 505 510

Leu Gly Ser Asn Ser Thr Pro Ser Val Gly Lys Val Ser Phe Ser Phe
515 520 525

Ser Leu Thr Ala Ala His Ser Gly Asn Tyr Tyr Cys Thr Ala Asp Asn
530 535 540

Gly Phe Gly Pro Gln Arg Ser Glu Ala Val Ser Leu Phe Val Thr Val
545 550 555 560

Pro Val Ser Arg Pro Ile Leu Thr Leu Arg Val Pro Arg Ala Gln Ala
565 570 575

Val Val Gly Asp Leu Leu Glu Leu Arg Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser
580 585 590

Pro Pro Ile Met Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Ser
595 600 605

Ser Ser Val Pro Ser Gly Gly Glu Ala Ser Phe Asn Leu Ser Leu Thr
610 615 620

Ala Glu His Ser Gly Asn Tyr Ser Cys Glu Ala Asn Asn Gly Leu Val
625 630 635 640

Ala Gln His Ser Asp Thr Ile Ser Leu Ser Val Ile Val Pro Val Ser
645 650 655

Arg Pro Ile Leu Thr Phe Arg Ala Pro Arg Ala Gln Ala Val Val Gly
660 665 670

Asp Leu Leu Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Ser Pro Ile
675 680 685

Leu Tyr Trp Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Lys Ile Ser Ala
690 695 700

Pro Ser Gly Gly Gly Ala Tyr Phe Asn Leu Ser Leu Thr Thr Glu His
705 710 715 720

Ser Gly Ile Tyr Ser Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Glu Ala Gln Arg
725 730 735

Ser Glu Met Val Thr Leu Lys Val Ala Val Pro Val Ser Arg Pro Val
740 745 750

Leu Thr Leu Arg Ala Pro Arg Ala Gln Val Ala Val Gly Asp Leu Leu
755 760 765

Glu Leu His Cys Glu Ala Leu Arg Gly Ser Pro Leu Ile Leu Tyr Gln
770 775 780

Phe Tyr His Glu Asp Val Thr Leu Gly Asn Ser Ser Ala Leu Ser Gly
785 790 795 800

Gly Ala Phe Phe Asn Leu Ser Leu Thr Ala Glu His Gly Asn Tyr Ser
805 810 815

```
Cys Glu Ala Asp Asn Gly Leu Gly Ala Gln Arg Ser Glu Thr Val Thr
            820                 825                 830

Leu Tyr Leu Thr Gly Leu Thr Glu Asn Arg Ser Gly Pro Val Ala Thr
        835                 840                 845

Gly Val Thr Gly Gly Leu Leu Ser Leu Ala Gly Leu Ala Ala Val Ala
    850                 855                 860

Leu Leu Leu Tyr Cys Trp Leu Ser Arg Lys Ala Gly Arg Glu Pro Ala
865                 870                 875                 880

Ser Asp Pro Cys Arg Ser Pro Ser Asp Leu Asp Ser Gln Glu Pro Thr
                885                 890                 895

Tyr His Asn Val Pro Ala Trp Glu Glu Leu Gln Pro Val Tyr Ser Asn
            900                 905                 910

Val Asn Pro Arg Gly Glu Asn Val Val Tyr Ser Glu Val Arg Ile Ile
        915                 920                 925

Arg Glu Lys Lys Lys His Ala Val Ala Ser Asn Pro Arg His Leu Arg
    930                 935                 940

Asn Lys Gly Ser Cys Ile Ile Tyr Ser Glu Val Lys Val Ala Ser Thr
945                 950                 955                 960

Pro Ala Ser Arg Cys Leu Phe Leu Ala Ser Ser Ala Pro His Arg
                965                 970                 975
```