



(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)



1-0033111

(51)⁷ C07K 16/28

(13) B

(21) 1-2018-01398

(22) 30/09/2016

(86) PCT/EP2016/073413 30/09/2016

(87) WO 2017/055542 06/04/2017

(30) 15188067.1 02/10/2015 EP

(45) 25/09/2022 414

(43) 27/08/2018 365A

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

Grenzacherstrasse 124, 4070 Basel, Switzerland

(72) DUERR, Harald (DE); FENN, Sebastian (DE); GOEPFERT, Ulrich (DE); IMHOF-JUNG, Sabine (DE); KLEIN, Christian (DE); LARIVIERE, Laurent (FR); MOLHOJ, Michael (DK); REGULA, Joerg Thomas (DE); RUEGER, Petra (DE); SCHAEFER, Wolfgang (DE).

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

(54) KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG CD20 CỦA NGƯỜI/THỤ THỂ
TRANSFERIN CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

(57) Sáng chế đề cập đến các kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người và dược phẩm chứa kháng thể này.

Lĩnh vực kỹ thuật được đề cập

Sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người và thụ thể transferin của người, phương pháp sản xuất chúng, được phẩm chứa các kháng thể này, và việc sử dụng chúng.

Tình trạng kỹ thuật của sáng chế

Tế bào lympho là một trong nhiều tập hợp của các tế bào bạch cầu. Chúng nhận diện đặc hiệu và đáp ứng với kháng nguyên lạ. Ba lớp tế bào lympho chính là tế bào lympho B (tế bào B), tế bào lympho T (tế bào T) và tế bào diệt tự nhiên (NK). Tế bào lympho B là các tế bào chịu trách nhiệm cho việc sản xuất kháng thể và tạo ra miễn dịch thể dịch. Tế bào B trưởng thành trong tủy xương và rời khỏi tủy biểu hiện kháng thể gắn kết kháng nguyên trên bề mặt tế bào của chúng. Khi tế bào B non lần đầu gặp kháng nguyên mà kháng thể gắn kết màng của nó đặc hiệu, tế bào này bắt đầu phân chia nhanh chóng và thế hệ sau của nó biệt hóa thành các tế bào B ghi nhớ và tế bào tác động được gọi là "tế bào huyết tương". Tế bào B ghi nhớ có khoảng thời gian sống dài hơn và tiếp tục biểu hiện kháng thể gắn kết màng có cùng tính đặc hiệu như tế bào bố mẹ ban đầu. Các tế bào huyết tương không sản xuất kháng thể gắn kết màng nhưng thay vào đó sản xuất dạng tuần hoàn của kháng thể đó. Kháng thể tuần hoàn là phân tử tác động chính của miễn dịch thể dịch.

Kháng nguyên CD20 (còn được gọi là kháng nguyên biệt hóa giới hạn tế bào lympho B của người, Bp35) là protein xuyên màng kỵ nước có phân tử lượng xấp xỉ 35 kDa nằm trên các tế bào lympho tiền B và B trưởng thành (Valentine et al., J. Biol. Chem. 264 (1989) 11282-11287; và Einfeld et al., EMBO J. 7 (1988) 711-717). Kháng nguyên này cũng được biểu hiện trên hơn 90% các u lympho không Hodgkin tế bào B (NHL) (Anderson et al., Blood 63 (1984) 1424-1433), nhưng không được phát hiện ra trên các tế bào gốc tạo huyết, tiền tế bào B, tế bào huyết tương bình thường hoặc mô bình thường khác (Tedder et al., J. Immunol. 135 (1985) 973-979). CD20 được cho là điều hòa (các) bước ban đầu trong quá trình hoạt hóa sự khởi đầu chu trình tế bào và sự biệt hóa (Tedder et al., ở trên) và có thể hoạt động như kênh ion canxi (Tedder et al., J. Cell. Biochem. 14D (1990) 195).

Nhờ tạo ra sự biểu hiện của CD20 trong u lympho tế bào B, kháng nguyên này là đích điều trị hữu ích để điều trị dạng u lympho này. Nhờ tạo ra sự biểu hiện của CD20 trong u lympho tế bào B, kháng nguyên này có thể đóng vai trò làm đối tượng “hướng đích” của dạng u lympho này. Về bản chất, sự hướng đích này có thể được khái quát như sau: kháng thể đặc hiệu với kháng nguyên bề mặt CD20 của tế bào B được dùng cho bệnh nhân. Các kháng thể kháng CD20 này gắn kết đặc hiệu với kháng thể CD20 của (có vẻ là) cả tế bào B bình thường và tế bào B ác tính; kháng thể gắn kết kháng nguyên bề mặt CD20 có thể dẫn đến việc phá hủy và làm tiêu khối u tế bào B. Ngoài ra, các hóa chất hoặc chất đánh dấu phóng xạ có tiềm năng phá hủy khối u có thể liên hợp với kháng thể kháng CD20 này sao cho chất này “được phân phối” đặc hiệu tới khối u tế bào B. Không phân biệt cách tiếp cận, mục đích chính đều là để phá hủy khối u; cách tiếp cận cụ thể có thể được xác định bằng kháng thể kháng CD20 cụ thể được sử dụng và, do đó, các phương pháp tiếp cận sẵn có để hướng đích kháng thể CD20 có thể thay đổi đáng kể. Ví dụ, kháng thể rituximab (RITUXAN®) mà là kháng thể đơn dòng khảm của chuột/người đã được thiết kế di truyền được định hướng kháng kháng nguyên CD20 của người (có thể mua được trên thị trường từ Genentech, Inc., South San Francisco, California, Mỹ) được sử dụng để điều trị cho bệnh nhân bị u lympho không Hodgkin tế bào B dương tính với CD20 dạng tái phát hoặc kháng mức độ thấp hoặc có nang. Rituximab là kháng thể được đề cập đến là "C2B8" trong US 5736137 và trong US 5776456. Các nghiên cứu về cơ chế tác động *in vitro* đã chứng minh rằng RITUXAN® gắn kết với bề mặt ở người và làm phân hủy dòng tế bào B lymphoít nhờ tính gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement-dependent cytotoxicity) (Reff et al., Blood 83 (1994) 435-445). Ngoài ra, nó có hoạt tính đáng kể trong các thử nghiệm về tính gây độc tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity). Nghiên cứu tiền lâm sàng *in vivo* đã cho thấy rằng RITUXAN® làm tiêu tế bào B khỏi máu ngoại vi, hạch bạch huyết, và tủy xương của khỉ cynomolgus, có lẽ là qua các quy trình qua trung gian bổ thể và quá trình qua trung gian tế bào (Reff et al., Blood 83 (1994) 435-445). Các kháng thể kháng CD20 khác được chỉ định để điều trị NHL bao gồm kháng thể chuột Zevalin™ liên kết với đồng vị phóng xạ, Yttrium-90 (IDEC Pharmaceuticals, San Diego, CA, Mỹ), Bexxar™ mà là một kháng thể chuột đầy đủ khác liên hợp với I-131 (Corixa, WA, Mỹ).

CD20 cũng là kháng nguyên đích hữu ích để điều trị bệnh tự miễn. Rituximab cũng được nghiên cứu trong một loạt các rối loạn tự miễn không ác tính, trong đó tế bào B và tự kháng thể xuất hiện giữ vai trò trong sinh lý bệnh học của bệnh (xem tài liệu, ví dụ, Edwards et al., *Biochem. Soc. Trans.* 30 (2002) 824-828). Rituximab được báo cáo có khả năng làm giảm dấu hiệu và các triệu chứng của, ví dụ, bệnh viêm khớp dạng thấp (RA - rheumatoid arthritis) (Leandro et al., *Ann. Rheum. Dis.* 61 (2002) 883-888; Edwards et al., *Arthritis Rheum.* 46 (Suppl. 9) (2002) S46; Stahl et al., *Ann. Rheum. Dis.* 62 (Suppl. 1) (2003) OP004; Emery et al., *Arthritis Rheum.* 48 (2003) S439), bệnh luput (Eisenberg, *Arthritis. Res. Ther.* 5 (2003) 157-159; Leandro et al., *Arthritis Rheum.* 46 (2002) 2673-2677; Gorman et al., *Luput*, 13 (2004) 312-316), chứng xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch (D'Arena et al., *Leuk. Lymphoma* 44 (2003) 561-562; Stasi et al., *Blood* 98 (2001) 952-957; Saleh et al., *Semin. Oncol.* 27 (Suppl. 12) (2000) 99-103; Zaia et al., *Haematologica* 87 (2002) 189-195; Ratanatharathorn et al., *Ann. Int. Med.* 133 (2000) 275-279), chứng ngừng phát triển tế bào hồng cầu sạch (Auner et al., *Br. J. Hematol.* 116 (2002) 725-728); chứng thiếu máu tự miễn (Zaja et al., *Haematologica* 87 (2002) 189-195 (erratum appears in *Haematologica* 87 (2002) 336), bệnh ngưng kết tổ lạnh (Layios et al., *Leukemia* 15 (2001) 187-188; Berentsen et al., *Blood* 103 (2004) 2925-2928; Berentsen et al., *Br. J. Hematol.* 115 (2001) 79-83; Bauduer, *Br. J. Hematol.* 112 (2001) 1083-1090; Damiani et al., *Br. J. Hematol.* 114 (2001) 229-234), hội chứng kháng insulin typ B nghiêm trọng (Coll et al., *N. Engl. J. Med.* 350 (2004) 310-311, bệnh cryoglobulin huyết hỗn hợp (De Vita et al., *Arthritis Rheum.* 46 Suppl. 9 (2002) S206/S469), bệnh nhược cơ (Zaja et al., *Neurology* 55 (2000) 1062-1063; Wylam et al., *J. Pediatr.* 143 (2003) 674-677), bệnh u hạt Wegener (Specks et al., *Arthritis & Rheumatism* 44 (2001) 2836-2840), bệnh chống lại bệnh pemphigut thông thường (Dupuy et al., *Arch. Dermatol.* 140 (2004) 91-96), bệnh viêm da cơ (Levine, *Arthritis Rheum.* 46 (Suppl. 9) (2002) S1299), hội chứng Sjogren (Somer et al., *Arthritis & Rheumatism* 49 (2003) 394-398), bệnh cryoglobulin-huyết kết hợp typ II hoạt động (Zaja et al., *Blood* 101 (2003) 3827-3834), bệnh pemphigut thông thường (Dupay et al., *Arch. Dermatol.* 140 (2004) 91-95), bệnh thần kinh tự miễn (Pestronk et al., *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry* 74 (2003) 485-489), hội chứng co giật mắt-co giật cơ cận ung thư (Pranzatelli et al. *Neurology* 60 (Suppl. 1) (2003) PO5.128:A395), và bệnh xơ cứng rải rác tái phát-thuyên giảm (RRMS) (Cross et al. (tóm tắt) "Preliminary

results from a phase II trial of Rituximab in MS" Eighth Annual Meeting of the Americas Committees for Research and Treatment in Multiple Sclerosis, (2003) 20-21).

Các công bố liên quan đến liệu pháp bằng rituximab bao gồm: Perotta and Abuel, Blood 10 (1998) (phần 1-2) 88B; Perotta et al., Blood 94 (1999) 49 (tóm tắt); Matthews, R., Ann. Rheum. Dis, ở trên; Leandro et al., Arthritis and Rheumatism 44(9): S370 (2001); Leandro et al., Arthritis and Rheumatism 46 (2002) 2673-2677; Weide et al., Luput 12 (2003) 779-782; Edwards and Cambridge, Rheumatology 40 (2001) 205-211; Cambridge et al., Arthritis Rheum. 46 (Suppl. 9) (2002) S1350; Edwards et al., Arthritis and Rheumatism 46 (2002) S197; Levine and Pestronk, Neurology 52 (1999) 1701-1704; De Vita et al., Arthritis & Rheum. 46 (2002) 2029-2033; Hidashida et al., Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002; Tuscano, J., Annual Scientific Meeting of the American College of Rheumatology; Oct 24-29; New Orleans, LA 2002; Martin and Chan, Immunity 20 (2004) 517-527; Silverman and Weisman, Arthritis and Rheumatism 48 (2003) 1484-1492; Kazkaz and Isenberg, Current opinion in pharmacology 4 (2004) 398-402; Virgolini and Vanda, Biomedicine & pharmacotherapy 58 (2004) 299-309; Klemmer et al., Arthritis and Rheumatism 48 (2003) 9,S (SEP) S624-S624; Kneitz et al., Immunobiology 206 (2002) 519-527; Arzoo et al., Annals of the Rheumatic Diseases 61 (2002) p922-924; Comment in Ann. Rheum. Dis. 61 (2002) 863-866; "Future Strategies in Immunotherapy" bởi Lake và Dionne, trong Burger's Medicinal Chemistry and Drug Discovery (2003 bởi John Wiley & Sons, Inc.); Liang and Tedder, Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine, phiên: CD20 as an Immunotherapy Target, 2002 tiêu đề "CD20"; Phụ lục 4A có tiêu đề "Monoclonal Antibodies to Human Cell Surface Antigens" bởi Stockinger et al., Eds: Coligan et al., trong Current Protocols in Immunology (2003 John Wiley & Sons, Inc.); Penichet and Morrison, "CD Antibodies/molecules: Definition; Antibody Engineering" trong Wiley Encyclopedia of Molecular Medicine Section: Chimeric, Humanized and Human antibodies; được đăng trực tuyến ngày 15 tháng 01 năm 2002; Specks et al., Arthritis & Rheumatism 44 (2001) 2836-2840; Koegh et al., "Rituximab for Remission Induction in Severe ANCA-Associated Vasculitis: Report of a Prospective Open-Label Pilot Trial in 10 Patients", American College of Rheumatology, Số phiên: 28-100, Tiêu đề phiên: Vasculitis, Kiểu phiên: ACR Concurrent Session, Danh mục chính: 28 Vasculitis, Phiên 10/18/2004

(<http://www.abstractsonline.com/viewer/SearchResults.asp>); Eriksson, Kidney and Blood Pressure Research 26 (2003) 294; Jayne et al., Kidney and Blood Pressure Research, 26 (2003) 294; Jayne, thông cáo 88 (11th International Vasculitis and ANCA workshop), 2003 American Society of Nephrology; Stone and Specks in the Clinical Trial Research Summary of the 2002-2003 Immune Tolerance Network, <http://www.immunetolerance.org/research/autoimmune/trials/stone.html>; Leandro et al., Arthritis Rheum. 48 (Suppl. 9) (2003) S1160.

Các Patent và công bố đơn sáng chế liên quan đến kháng thể CD20 bao gồm US 5776456, US 5736137, US 5843439, US 6399061, US 6682734, US 2002/0197255 A1, US 2003/0021781 A1, US 2003/0082172 A1, US 2003/0095963 A1, US 2003/0147885 A1; US 6455043; WO 00/09160; WO 00/27428; WO 00/27433; WO 00/44788; WO 01/10462; WO 01/10461; WO 01/10460; US 2001/0018041 A1, US 2003/0180292 A1, WO 01/34194; US 2002/0006404; WO 02/04021; US 2002/0012665 A1; WO 01/74388; US 2002/0058029 A1; US 2003/0103971 A1; US 2002/0009444 A1; WO 01/80884; WO 01/97858; US 2002/0128488 A1; WO 02/34790; WO 02/060955; WO 02/096948; WO 02/079255; US 6,171,586 B1; WO 98/56418; WO 98/58964; WO 99/22764; WO 99/51642; US 6194551 B1; US 6242195 B1; US 6528624 B1; US 6538124; WO 00/42072; WO 00/67796; WO 01/03734; US 2002/0004587 A1; WO 01/77342; US 2002/0197256; US 2003/0157108 A1; US 6565827 B1; US 6090365 B1; US 6287537 B1; US 6015542; US 5843398; US 5595721; US 5500362; US 5677180; US 5721108; US 6120767; US 6652852 B1; US 6410391 B1; US 6224866 B1; WO 00/20864; WO 01/13945; WO 00/67795; US 2003/0133930 A1; WO 00/74718; WO 00/76542; WO 01/72333; US 6368596 B1; US 6306393; US 2002/0041847 A1; US 2003/0026801 A1; WO 02/102312; US 2003/0068664; WO 03/002607; WO 03/049694; US 2002/0009427 A1; US 2003/0185796 A1; WO 03/061694; US 2003/0219818 A1; US 2003/0219433 A1; WO 03/068821; US 2002/0136719 A1; WO 2004/032828; WO 2004/035607; US 2004/0093621; US 5849898; EP 0330191; US 4861579; EP 0332865; WO 95/03770; US 2001/0056066; WO 2004/035607; WO 2004/056312; US 2004/0093621; WO 2004/103404. Các công bố đơn liên quan đến kháng thể CD20 bao gồm: Teeling, J., et al., Blood 10 (2004) 1182.

WO 2014/033074 đề cập đến con thoi hàng rào máu não mà liên kết các thụ thể trên hàng rào máu não và phương pháp sử dụng chúng. Kháng thể thụ thể hàng rào máu não ái lực thấp và việc sử dụng chúng được báo cáo trong WO 2012/075037. WO 2014/189973 đề cập đến kháng thể kháng thụ thể transferin và phương pháp sử dụng chúng. Mô đun con thoi hàng rào máu não chứa chất tác động não, tác nhân liên kết và một chất gắn kết hóa trị một mà gắn kết với thụ thể hàng rào máu não được báo cáo trong WO 2015/101588. WO 2010/033587 liên quan đến phương pháp điều trị bệnh xơ cứng rải rác tiến triển ở bệnh nhân, và vật phẩm sản xuất kèm hướng dẫn để sử dụng cho bệnh đó. Phương pháp điều trị, làm ngừng hoặc ngăn ngừa bệnh đáp ứng với việc điều trị bằng các kháng thể kháng CD20 ở bệnh nhân mắc bệnh, bao gồm việc cho bệnh nhân đó dùng ít nhất một liều làm tiêu phụ của kháng thể kháng CD20 được báo cáo trong WO 2012/096924. Hawker, K., et al. (Ann. Neurol. 66 (2009) 460-471) đã báo cáo về kết quả của thử nghiệm đa nhân kiểm soát bằng giả dược mù đôi ngẫu nhiên của Rituximab ở bệnh nhân mắc bệnh xơ cứng rải rác tiến triển nguyên phát.

Bản chất kỹ thuật của sáng chế

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể (chiều dài đầy đủ) chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể (chiều dài đầy đủ) và chuỗi nặng kháng thể (chiều dài đầy đủ), trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong số các cặp chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ) và chuỗi nhẹ (chiều dài đầy đủ) này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và

b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C bất kỳ của một chuỗi nặng của kháng thể (chiều dài đầy đủ), trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong số các chuỗi nhẹ kháng thể (chiều dài đầy đủ) chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong số các chuỗi nặng kháng thể (chiều dài đầy đủ) chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc

lysine kiểu đại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysine kiểu đại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai này chứa miền trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) và miền chuỗi nặng hằng định 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin của người.

Theo một phương án, mảnh Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit.

Theo một phương án, đầu tận N của miền biến đổi chuỗi nặng của mảnh Fab được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ) hoặc đầu tận C của tác nhân liên kết peptit.

Theo một phương án,

a) chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ) được dung hợp với mảnh Fab bổ sung có các gốc axit amin (chuỗi nặng) đầu tận C là tripeptit LSP trong đó prolin của nó được dung hợp trực tiếp với gốc axit amin thứ nhất của mảnh Fab bổ sung hoặc của tác nhân liên kết peptit thông qua liên kết peptit, và

b) chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ) không được dung hợp với mảnh Fab bổ sung có các gốc axit amin (chuỗi nặng) đầu tận C là tripeptit LSP, hoặc SPG, hoặc PGK.

Theo một phương án, kháng thể (chiều dài đầy đủ) là

- a) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người,
- b) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người,
- c) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G,
- d) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G,
- e) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G trong cả hai chuỗi nặng và đột biến i) T366W, và ii)

S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng còn lại tương ứng,

f) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G trong cả hai chuỗi nặng và đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng còn lại tương ứng,

g) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, I253A, H310A và H435A trong cả hai chuỗi nặng và đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng còn lại tương ứng, hoặc

h) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T và T256E trong cả hai chuỗi nặng và đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng còn lại tương ứng, hoặc

i) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, H310A, H433A và Y436A trong cả hai chuỗi nặng và đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng còn lại tương ứng.

Theo một phương án, mảnh Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng chứa đột biến T366W, hoặc với đầu tận C của chuỗi nặng chứa đột biến T366S, L368A, và Y407V.

Theo một phương án,

kháng thể (chiều dài đầy đủ) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G trong cả hai chuỗi nặng và đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng còn lại tương ứng, và

mảnh Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng chứa đột biến T366W, hoặc với đầu tận C của chuỗi nặng chứa đột biến T366S, L368A, và Y407V.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép chứa

- i) chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 01 là 70% hoặc nhiều hơn,
- ii) chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 02 là 70% hoặc nhiều hơn,
- iii) chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 03 là 70% hoặc nhiều hơn, và
- iv) mảnh Fab chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 04 là 70% hoặc nhiều hơn,

trong đó

SEQ ID NO: 01 có trình tự axit amin

DIVMTQTPLSLPVTGPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQ
LLIYQMSNLVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLEL
PYTFGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYEEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC,

SEQ ID NO: 02 có trình tự axit amin

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEW
MGRIFPGDGDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSEDYAVYY
CARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVEDYFPEPVTVSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT
ISKAKGQPREPQVCTLPSPSRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSDGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG,

SEQ ID NO: 03 có trình tự axit amin

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYR
ASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISLQPEDFATYYCQQNYASSNVDNT

FGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSC, và

SEQ ID NO: 04 có trình tự axit amin

QSMQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSSYAMSWIRQHPGKGLEWIGY
IWSGGSTDYASWAKSRVTISKSTSTTVSLKLSSVTAADTAVYYCARRYG
TSYPDYGDASGFDPWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTYLSSTL
TLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa chuỗi nhẹ (chiều dài đầy đủ) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 01, chuỗi nặng (chiều dài đầy đủ) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 02, chuỗi nhẹ (chiều dài đầy đủ) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, và mảnh Fab của kháng thể chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 04.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể đơn dòng.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) mảnh Fab thứ nhất và mảnh Fab thứ hai, trong đó mỗi vị trí gắn kết của mảnh Fab thứ nhất và mảnh Fab thứ hai này gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất,

b) mảnh Fab thứ ba, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab thứ ba này gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, và trong đó mảnh Fab thứ ba này chứa miền trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ biến đổi (VL) và miền chuỗi nặng biến đổi (VH) được thay thế cho nhau, và

c) vùng Fc chứa polypeptit vùng Fc thứ nhất và polypeptit vùng Fc thứ hai, trong đó mỗi trong số mảnh Fab thứ nhất và mảnh Fab thứ hai chứa mảnh chuỗi nặng và chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ,

trong đó đầu tận C của mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab thứ nhất được dung hợp với đầu tận N của polypeptit vùng Fc thứ nhất,

trong đó đầu tận C của mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab thứ hai được dung hợp với đầu tận N của miền chuỗi nhẹ biến đổi của mảnh Fab thứ ba và đầu tận C của miền hằng định chuỗi nặng 1 của mảnh Fab thứ ba được dung hợp với đầu tận N của polypeptit vùng Fc thứ hai,

trong đó mỗi chuỗi kháng thể nhẹ có chiều dài đầy đủ của mảnh Fab thứ nhất và mảnh Fab thứ hai chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi mảnh chuỗi nặng của mảnh Fab thứ nhất và mảnh Fab thứ hai chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại axit amin; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Theo một phương án, polypeptit vùng Fc thứ nhất và polypeptit vùng Fc thứ hai là

- a) thuộc phân lớp IgG1 của người,
- b) thuộc phân lớp IgG4 của người,
- c) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G,
- d) thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G,
- e) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G trong cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng,
- f) thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G trong cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng,

g) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, I253A, H310A và H435A trong cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng, hoặc

h) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T và T256E trong cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng, hoặc

i) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, H310A, H433A và Y436A trong cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng.

Theo một phương án, một trong các chuỗi của mảnh Fab thứ ba được dung hợp với polypeptit vùng Fc có đột biến T366W, hoặc với polypeptit vùng Fc có đột biến T366S, L368A, và Y407V.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép chứa

i) chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 14 ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc nhiều hơn,

ii) chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 15 ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc nhiều hơn,

iii) chuỗi kháng thể chéo có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 16 ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc nhiều hơn, và

iv) chuỗi nặng được cải biến có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 17 ít nhất 70%, hoặc ít nhất 80%, hoặc ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc nhiều hơn,

trong đó

SEQ ID NO: 14 có trình tự axit amin

DIVMTQTPLSLPVTGPASISCRSSKSLHNSGITYLYWYLQKPGQSPQ
LLIYQMSNLSVGVLPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLEL
PYTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREA

KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLTLSKADYKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC,

SEQ ID NO: 15 có trình tự axit amin

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEW
MGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYY
CARNVFDGYWL VYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA
KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT
ISKAKGQPREPQVCTLP SRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDS DGSFFLVSKLTVDKSRWQQGNVFSCSVMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG,

SEQ ID NO: 16 có trình tự axit amin

QSMQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSSYAMSWIRQHPGKGLEWIGY
IWSGGSTDYASWAKSRVTISK TSTTVSLKLSSVTAADTAVYYCARYG
TSYPDYGDASGFDPWGQGT LTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDYSLSTLT
LSKADYKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC, và

SEQ ID NO: 17 có trình tự axit amin

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEW
MGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYY
CARNVFDGYWL VYWGQGTL VTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVEDYFPEPVT VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDGGGGSGGGGSAIQLTQSP
SSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYRASTLASGV
PSRFSGSGSGTDFTLTIS SLQPEDFATYYCQQNYASSNVDNTFGGGTKV
EIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA LGCLVKDYFPEPVT VSWNSGA
LTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVD
KKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPSVFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCV
VVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNAKTKPREEQYNSTYRVVSVLTVL

HQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKTISKAKGQPREPQVYTLPPCRDE
 LTKNQVSLWCLVKGFYPSDIAVEWESNGQPENNYKTTPPVLDSDGSFF
 LYSKLTVDKSRWQQGNVFCSSVMHEALHNHYTQKSLSLSPG.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa hai chuỗi nhẹ có chiều dài đầy đủ mỗi chuỗi có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 14, chuỗi nặng có chiều dài đầy đủ có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 15, chuỗi kháng thể chéo có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 16, và chuỗi nặng được cải biến có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 17.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép là kháng thể đơn dòng.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là axit nucleic được phân lập mã hóa kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là tế bào chủ chứa axit nucleic như được báo cáo trong bản mô tả này mã hóa kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp sản xuất kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này bao gồm các bước dưới đây:

- a) nuôi cấy tế bào chủ như được báo cáo trong bản mô tả này sao cho kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra, và
- b) thu hồi kháng thể đặc hiệu kép này từ tế bào hoặc môi trường nuôi cấy và theo đó sản xuất ra kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này.

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

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này và chất mang dược dụng.

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

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này để điều trị bệnh ung thư.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị bệnh tăng sinh tế bào B.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để sử dụng trong việc ức chế sự phát triển của các tế bào khối u biểu hiện CD20. Theo một phương án, việc ức chế này là ở trong não.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị caxinom. Theo một phương án được ưu tiên, caxinom là caxinom của/trong não.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để sử dụng trong việc điều trị u lympho. Theo một phương án được ưu tiên, u lympho là u lympho hệ thần kinh trung ương nguyên phát (PCNSL - primary central nervous system lymphoma).

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này sử dụng để điều trị bệnh tự miễn. Theo một phương án, bệnh tự miễn là bệnh xơ cứng rải rác. Theo một phương án được ưu tiên bệnh tự miễn là bệnh xơ cứng rải rác phát triển thứ phát.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để sử dụng trong việc làm tiêu các tế bào khối u biểu hiện CD20. Theo một phương án, việc làm tiêu này là ở trong não.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để sử dụng trong việc làm tiêu tế bào B tuần hoàn biểu hiện CD20. Theo một phương án, việc làm tiêu này là ở trong não.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để sử dụng trong việc làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là sử dụng kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để bào chế thuốc.

Theo một phương án, thuốc này để điều trị bệnh kiểu tăng sinh. Theo một phương án, bệnh kiểu tăng sinh là bệnh tăng sinh tế bào B. Theo một phương án, bệnh kiểu tăng sinh là u lympho tế bào B. Theo một phương án được ưu tiên, bệnh kiểu tăng sinh là u lympho hệ thần kinh trung ương nguyên phát.

Theo một phương án, thuốc này để điều trị khối u.

Theo một phương án, thuốc này để điều trị caxinom ở người.

Theo một phương án, thuốc này để điều trị bệnh tự miễn. Theo một phương án, bệnh tự miễn được chọn từ nhóm bao gồm đáp ứng viêm như bệnh viêm da bao gồm bệnh vẩy nến và viêm da (ví dụ, viêm da dị ứng); xơ cứng bì toàn thân và xơ cứng; đáp ứng liên quan đến bệnh viêm ruột (như bệnh Crohn và viêm ruột kết mạn loét); hội chứng suy hô hấp (bao gồm hội chứng suy hô hấp người trưởng thành; ARDS); viêm da; viêm màng não; viêm não; viêm màng mạch nhỏ; viêm ruột kết; viêm thận tiểu cầu; các tình trạng dị ứng như eczema và bệnh hen và các tình trạng bệnh lý khác liên quan đến sự xâm nhập của các tế bào T và đáp ứng viêm mạn tính; xơ vữa động mạch; thiếu hụt kết dính bạch cầu; viêm khớp dạng thấp; luput ban đỏ toàn thân (SLE - systemic lupus erythematosus); bệnh đái tháo đường (ví dụ, bệnh đái tháo đường typ I hoặc bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin); bệnh xơ cứng rải rác; hội chứng Reynaud; viêm tuyến giáp tự miễn; viêm não và dây cột sống do dị ứng; hội chứng Sjogren; bệnh đái tháo đường khởi phát ở tuổi vị thành niên; và đáp ứng miễn dịch liên quan đến tính quá mẫn cấp tính và bị trì hoãn điều tiết bởi xytokin và tế bào lympho T thường được tìm thấy ở bệnh lao, bệnh sarcoit, viêm đa cơ, bệnh u hạt và viêm mạch; chứng thiếu máu ác tính (Bệnh Addison); bệnh liên quan đến xuyên mạch bạch cầu; rối loạn viêm hệ thần kinh trung ương (CNS); hội chứng tổn thương đa cơ quan; chứng thiếu máu tan máu (bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở chứng cryoglobulin huyết hoặc thiếu máu dương tính với nghiệm pháp Coombs); bệnh nhược cơ; bệnh điều tiết bởi phức chất kháng nguyên-kháng thể; bệnh kháng màng đáy cầu thận; hội chứng kháng phospholipit; viêm dây thần kinh dị ứng; bệnh Graves; hội chứng nhược cơ Lambert-Eaton; bong pemphigut; pemphigut; bệnh đa nội tiết tự miễn; bệnh Reiter; hội chứng cứng người; bệnh Bechet; viêm động mạch tế bào khổng lồ; viêm thận phức hợp miễn dịch; bệnh thận IgA; bệnh

đa dây thần kinh IgM; xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch (ITP - immune thrombocytopenic purpura) hoặc giảm tiểu cầu tự miễn. Theo một phương án, thuốc này để điều trị bệnh xơ cứng rải rác. Theo một phương án được ưu tiên, thuốc này để điều trị bệnh xơ cứng rải rác phát triển thứ phát.

Theo một phương án, thuốc để làm tiêu các tế bào khối u biểu hiện CD20. Theo một phương án, việc làm tiêu này là ở trong não.

Theo một phương án, thuốc này để làm tiêu tế bào B tuần hoàn biểu hiện CD20. Theo một phương án, việc làm tiêu này là ở trong não.

Theo một phương án, thuốc này để làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp điều trị cho cá thể mắc bệnh kiểu tăng sinh bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này. Theo một phương án, bệnh kiểu tăng sinh là bệnh tăng sinh tế bào B.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp điều trị cho cá thể mắc caxinom bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này. Theo một phương án được ưu tiên, caxinom là caxinom của/trong não.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp điều trị cá thể mắc u lympho bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này. Theo một phương án được ưu tiên, u lympho là u lympho hệ thần kinh trung ương nguyên phát (PCNSL - primary central nervous system lymphoma).

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp điều trị cho cá thể có bệnh tự miễn bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này. Theo một phương án, bệnh tự miễn là bệnh xơ cứng rải rác. Theo một phương án được ưu tiên, bệnh tự miễn là bệnh xơ cứng rải rác phát triển thứ phát.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp ức chế sự phát triển của các tế bào khối u biểu hiện CD20 ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này

dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để ức chế sự phát triển của các tế bào khối u biểu hiện CD20. Theo một phương án, việc ức chế này là ở trong não.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp làm tiêu các tế bào khối u biểu hiện CD20 ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để làm tiêu các tế bào khối u biểu hiện CD20. Theo một phương án, việc ức chế này là ở trong não.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp làm tiêu tế bào B tuần hoàn biểu hiện CD20 ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để làm tiêu tế bào B tuần hoàn biểu hiện CD20. Theo một phương án, việc ức chế này là ở trong não.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20 ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này để làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là phương pháp điều trị bệnh xơ cứng rải rác ở người bao gồm bước cho người này dùng một lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này mà gắn kết với CD20 của người và làm tiêu tế bào B, và trong đó kháng thể này không liên hợp với chất gây độc tế bào.

Mô tả chi tiết sáng chế

Các modun dime hóa tra khóa vào ổ và việc sử dụng chúng trong quá trình xử lý kỹ thuật cho kháng thể được mô tả trong tài liệu Carter P.; Ridgway J.B.B.; Presta L.G.: Immunotechnology, Volume 2, Number 1, February 1996, pp. 73-73. Cầu disulfua bổ sung trong miền CH3 được báo cáo trong tài liệu Merchant, A.M., et al., Nat. Biotechnol. 16 (1998) 677-681.

Thông tin tổng quát về trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng của globulin miễn dịch của người được nêu trong tài liệu: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins

of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991).

Trong bản mô tả này, các vị trí axit amin của tất cả các vùng và miền hằng định của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ được đánh số theo hệ thống đánh số Kabat 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) và được gọi là “đánh số theo Kabat” trong bản mô tả này. Cụ thể là, hệ thống đánh số Kabat (xem các trang từ 647 đến 660) trong tài liệu Kabat, et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991) được sử dụng cho miền hằng định chuỗi nhẹ CL của isotyp kappa và lambda, và hệ thống đánh số theo chỉ số Kabat EU (xem các trang từ 661 đến 723) được sử dụng cho miền hằng định chuỗi nặng (CH1, vùng bản lề, CH2 và CH3, trong bản mô tả này được nêu rõ hơn bằng cách nói đến “đánh số theo chỉ số Kabat EU” trong trường hợp này).

I. Định nghĩa

“Hàng rào máu não” hoặc “BBB” dùng để chỉ hàng rào sinh lý giữa hệ tuần hoàn ngoại vi và não và tủy sống được tạo ra bởi các điểm nối chắc chắn bên trong màng tế bào nội bì vi mạch máu não, tạo ra hàng rào chắc chắn hạn chế sự vận chuyển các phân tử vào trong não, ngay cả với các phân tử rất nhỏ như ure (60 Daltons). BBB trong não, hàng rào máu não tủy sống bên trong tủy sống, và hàng rào máu-võng mạc bên trong võng mạc là hàng rào mạch máu liên tục bên trong CNS, và trong bản mô tả này được gọi chung là hàng rào máu não hoặc BBB. BBB cũng bao gồm hàng rào máu-CSF (dây dăm rốn màng mạch) nơi mà hàng rào này được cấu thành từ tế bào đệm màng ống chứ không phải tế bào nội mô mạch.

Các thuật ngữ “kháng thể kháng CD20 của người” và “kháng thể gắn kết đặc hiệu vào CD20 của người” dùng để chỉ kháng thể có khả năng gắn kết peptit CD20 của người với ái lực thích hợp sao cho kháng thể này có thể được sử dụng làm chất chẩn đoán và/hoặc trị liệu trong hướng đích peptit CD20.

Do đó, thuật ngữ này cũng bao gồm kháng thể gắn kết mảnh ngắn của CD20 của người.

Các ví dụ về kháng thể gắn kết kháng thể CD20 bao gồm: “C2B8” hiện được gọi là “rituximab” (“RITUXAN®”) (US 5736137); kháng thể chuột 2B8 được đánh dấu ytri-[90] được ký hiệu là “Y2B8” (US 5736137); IgG2a “B1” chuột tùy ý được đánh dấu bằng 131I để tạo ra kháng thể “131I-B1” (BEXXAR™) (US 5595721); kháng thể chuột đơn dòng “1F5” (Press et al., Blood 69 (1987) 584-591); kháng thể “2H7 khảm” (US 5677180); kháng thể đơn dòng L27, G28-2, 93-1B3, B-C1 hoặc NU-B2 có thể mua được từ International Leukocyte Typing Workshop (Valentine et al., trong: Leukocyte Typing III (McMichael, Ed.) p. 440, Oxford University Press (1987)); và kháng thể đơn dòng được mô tả trong US 8883980.

Kháng nguyên “CD20” là phosphoprotein không được glycosyl hóa có phân tử lượng khoảng 35 kDa được tìm thấy trên bề mặt của trên 90% tế bào B từ máu ngoại vi hoặc các cơ quan lympho. CD20 được biểu hiện trong quá trình phát triển sớm của tiền tế bào B và duy trì cho đến khi biệt hóa huyết tương tế bào. CD20 có mặt trên cả tế bào B bình thường cũng như tế bào B ác tính. Tên khác của CD20 trong các tài liệu bao gồm “kháng nguyên hạn chế tế bào lympho B” và “Bp35”. Kháng thể CD20 được mô tả trong tài liệu Clark et al. Proc. Natl. Acad. Sci USA 82 (1985) 1766 chẳng hạn. Xem thêm SEQ ID NO: 05.

“Bệnh tự miễn” trong bản mô tả này là bệnh hoặc rối loạn không ác tính phát sinh từ và được định hướng kháng các mô của cá thể. Thuật ngữ “bệnh tự miễn” như được sử dụng trong bản mô tả này đặc biệt không bao gồm bệnh hoặc tình trạng bệnh ác tính hoặc ung thư, cụ thể là không bao gồm u lympho tế bào B, bệnh bạch cầu lympho cấp tính (ALL – acute lymphoblastic leukemia), bệnh bạch cầu lympho mạn tính (CLL – chronic lymphocytic leukemia), bệnh bạch cầu tế bào tua và bệnh bạch cầu nguyên bào tủy mạn tính. Các ví dụ về bệnh hoặc rối loạn tự miễn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, đáp ứng viêm như bệnh viêm da bao gồm bệnh vẩy nến và viêm da (ví dụ, viêm da dị ứng); xơ cứng bì toàn thân và xơ cứng; đáp ứng liên quan đến bệnh viêm ruột (như bệnh Crohn và viêm ruột kết mạn loét); hội chứng suy hô hấp (bao gồm hội chứng suy hô hấp người trưởng thành; ARDS); viêm da; viêm màng não; viêm não; viêm màng mạch nhỏ; viêm ruột kết; viêm thận tiểu cầu; tình trạng dị ứng như eczema và bệnh hen và các tình trạng bệnh lý khác liên quan đến sự xâm nhập của các tế bào T và đáp ứng viêm mạn tính; xơ vữa động mạch; thiếu hụt kết dính bạch cầu; viêm khớp dạng thấp;

luput ban đỏ toàn thân (SLE); bệnh đái tháo đường (ví dụ, bệnh đái tháo đường typ I hoặc bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin); bệnh xơ cứng rải rác; hội chứng Reynaud; viêm tuyến giáp tự miễn; viêm não và dây cột sống do dị ứng; hội chứng Sjogren; bệnh đái tháo đường khởi phát ở tuổi vị thành niên; và đáp ứng miễn dịch liên quan đến tính quá mẫn cấp tính và bị trì hoãn điều tiết bởi xytokin và tế bào lympho T thường được tìm thấy ở bệnh lao, bệnh sarcoit, viêm đa cơ, bệnh u hạt và viêm mạch; chứng thiếu máu ác tính (Bệnh Addison); bệnh liên quan đến xuyên mạch bạch cầu; rối loạn viêm hệ thần kinh trung ương (CNS); hội chứng tổn thương đa cơ quan; chứng thiếu máu tan máu (bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở chứng cryoglobulin huyết hoặc chứng thiếu máu dương tính với nghiệm pháp Coombs); bệnh nhược cơ; bệnh điều tiết bởi phức chất kháng nguyên-kháng thể; bệnh kháng màng đáy cầu thận; hội chứng kháng phospholipit; viêm dây thần kinh dị ứng; bệnh Graves; hội chứng nhược cơ Lambert-Eaton; bệnh pemphigut; bệnh đa nội tiết tự miễn; bệnh Reiter; hội chứng cứng người; bệnh Bechet; viêm động mạch tế bào khổng lồ; viêm thận phức hợp miễn dịch; bệnh thận IgA; bệnh đa dây thần kinh IgM; chứng xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch (ITP - immune thrombocytopenic purpura) hoặc giảm tiểu cầu tự miễn v.v..

“Chất đối kháng” là phân tử mà, khi gắn kết với chỉ thị bề mặt tế bào B, thì phá hủy, diệt hoặc làm tiêu tế bào B ở động vật có vú và/hoặc can thiệp vào một hoặc nhiều chức năng tế bào B, ví dụ, bằng cách làm giảm hoặc ngăn ngừa đáp ứng thể dịch gây ra bởi tế bào B. Chất đối kháng này có thể làm tiêu tế bào B (nghĩa là làm giảm mức độ tuần hoàn tế bào B) ở động vật có vú được điều trị bằng chất này. Sự tiêu này có thể đạt được nhờ các cơ chế khác nhau như gây độc tế bào trung gian tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity) và/hoặc gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement-dependent cytotoxicity), ức chế sự tăng sinh tế bào B và/hoặc sự cảm ứng gây chết tế bào B (ví dụ, thông qua cơ chế chết tế bào theo chương trình). Chất đối kháng bao gồm kháng thể, peptit trình tự tổng hợp hoặc nguyên thể và các phân tử nhỏ mà gắn kết với chỉ thị tế bào B, tùy ý được liên hợp hoặc dung hợp với chất gây độc tế bào.

Chất đối kháng “ức chế sự phát triển” là các chất, mà ngăn ngừa hoặc làm giảm sự tăng sinh của tế bào biểu hiện kháng nguyên mà chất đối kháng gắn kết với. Ví dụ,

chất đối kháng này có thể ngăn ngừa hoặc làm giảm sự tăng sinh của tế bào B *in vitro* và/hoặc *in vivo*.

Chất đối kháng mà “cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình” là các chất cảm ứng sự chết tế bào theo chương trình, ví dụ, tế bào B, như được xác định bằng các thử nghiệm chuẩn về sự chết tế bào theo chương trình, như sự gắn kết của Annexin V, sự phân đoạn của ADN, sự co rút tế bào, sự giãn mạng lưới nội chất, sự phân đoạn tế bào, và/hoặc sự tạo thành bong bóng (được gọi là thể chết tế bào theo chương trình).

Chất đối kháng “liên kết” kháng nguyên đang quan tâm, ví dụ, chỉ thị bề mặt tế bào B, là chất có khả năng gắn kết kháng nguyên với ái lực và/hoặc khả năng thích hợp sao cho chất đối kháng này hữu ích làm chất trị liệu hướng đích tế bào biểu hiện kháng nguyên đó.

“Hệ thần kinh trung ương” hoặc “CNS” dùng để chỉ phức hợp của các mô thần kinh kiểm soát chức năng của cơ thể, và bao gồm não và tủy sống.

“Thụ thể hàng rào máu não” (được viết tắt là “BBBR” trong bản mô tả này) là protein thụ thể liên kết với màng ngoại bào được biểu hiện trên các tế bào nội mô của não mà có khả năng vận chuyển các phân tử qua BBB hoặc được sử dụng để vận chuyển phân tử được sử dụng ngoại sinh. Các ví dụ về BBBR trong bản mô tả này bao gồm: thụ thể transferin (TfR), thụ thể insulin, thụ thể yếu tố tăng trưởng giống insulin (IGF-R), thụ thể lipoprotein mật độ thấp bao gồm mà không giới hạn ở protein liên quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp 1 (LRP1) và protein liên quan đến thụ thể lipoprotein mật độ thấp 8 (LRP8), và yếu tố tăng trưởng giống yếu tố tăng trưởng biểu bì gắn kết heparin (HB-EGF). Một BBBR được ưu tiên là thụ thể transferin (TfR).

“Thụ thể transferin” (“TfR”) glycoprotein xuyên màng (với phân tử lượng bằng khoảng 180.000 Da) gồm hai cấu trúc siêu phân tử liên kết bằng disulphua (mỗi cấu trúc siêu phân tử có phân tử lượng biểu kiến là khoảng 90.000 Da) tham gia vào quá trình hấp thụ sắt ở động vật có xương sống. Theo một phương án, TfR như được đề cập trong bản mô tả này là TfR của người chứa trình tự axit amin như được nêu trong Schneider et al (Nature 311 (1984) 675-678) chẳng hạn.

“Kháng thể đa đặc hiệu” để chỉ kháng thể có các tính đặc hiệu gắn kết đối với ít nhất hai epitop khác nhau trên cùng một kháng nguyên hoặc hai kháng nguyên khác

nhau. Kháng thể đa đặc hiệu được lấy làm ví dụ có thể gắn kết với cả BBBR và kháng nguyên não. Kháng thể đa đặc hiệu có thể được tạo ra là kháng thể chiều dài đầy đủ hoặc mảnh kháng thể (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép $F(ab')_2$) hoặc tổ hợp của nó (ví dụ, kháng thể có chiều dài đầy đủ cộng mảnh scFv hoặc mảnh Fab bổ sung). Các kháng thể đã được xử lý kỹ thuật với hai, ba hoặc nhiều hơn ba (ví dụ 4) vị trí gắn kết kháng nguyên chức năng cũng đã được báo cáo (xem, ví dụ, US 2002/0004587 A1).

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

“Ái lực” dùng để chỉ độ bền của tổng toàn bộ các tương tác không cộng hóa trị giữa một vị trí gắn kết của phân tử (ví dụ, kháng thể) và đối tác gắn kết của nó (ví dụ, kháng nguyên). Trừ khi có quy định khác, trong bản mô tả này, “ái lực gắn kết” dùng để chỉ ái lực gắn kết thực chất mà phản ánh tương tác 1:1 giữa các thành viên của cặp gắn kết (ví dụ, kháng thể và kháng nguyên). Ái lực của phân tử X đối với đối tác Y của nó có thể thường được biểu diễn bằng hằng số phân ly (k_d). Ái lực có thể được đo bằng các phương pháp thông thường đã biết trong lĩnh vực này, như cộng hưởng plasmon bề mặt và bao gồm các phương pháp được mô tả trong bản mô tả này.

Kháng thể “thuần thực ái lực” dùng để chỉ kháng thể có một hoặc nhiều thay đổi trong một hoặc nhiều vùng siêu biến (HVR), so với kháng thể bố mẹ mà không có các thay đổi đó, các thay đổi này khiến cải thiện ái lực của kháng thể đối với (các) kháng nguyên của nó.

Thuật ngữ “kháng thể” trong bản mô tả này được sử dụng theo nghĩa rộng nhất và bao gồm các cấu trúc kháng thể khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, kháng

thể đơn dòng, kháng thể đa dòng, và kháng thể đa đặc hiệu (ví dụ, kháng thể đặc hiệu kép), miễn là chúng có hoạt tính gắn kết kháng nguyên mong muốn.

Thuật ngữ “khả năng gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ thuộc vào kháng thể (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity)” là một chức năng được điều tiết bằng cách gắn kết thụ thể Fc và dùng để chỉ sự phân giải tế bào đích bởi kháng thể như nêu trong bản mô tả này với sự có mặt của tế bào tác động. Theo một phương án, ADCC được đo bằng cách xử lý chế phẩm chứa các tế bào hồng cầu biểu hiện CD19 (ví dụ, tế bào K562 biểu hiện CD19 tái tổ hợp của người) bằng kháng thể nêu trong bản mô tả này với sự có mặt của tế bào tác động như PBMC (tế bào máu đơn nhân ngoại vi) mới được phân lập hoặc tế bào tác động được tinh chế từ các lớp đệm, như tế bào bạch cầu đơn nhân to hoặc tế bào NK (tế bào diệt tự nhiên). Tế bào đích được đánh dấu bằng ^{51}Cr và sau đó được ủ với kháng thể. Các tế bào đã đánh dấu được ủ với tế bào tác động và phân dịch nổi trên bề mặt được phân tích về ^{51}Cr được giải phóng. Các đối chứng bao gồm ủ tế bào nội mô đích với tế bào tác động nhưng không có kháng thể. Khả năng của kháng thể trong việc cảm ứng các bước ban đầu điều tiết ADCC được nghiên cứu bằng cách đo mức gắn kết của chúng vào các tế bào biểu hiện thụ thể Fc γ , như các tế bào, biểu hiện tái tổ hợp Fc γ RI và/hoặc Fc γ RIIA hoặc tế bào NK (chủ yếu biểu hiện Fc γ RIIA). Theo một phương án được ưu tiên, mức gắn kết vào Fc γ R trên tế bào NK được đo.

“Mảnh kháng thể” dùng để chỉ phân tử không phải là kháng thể nguyên vẹn nhưng chứa một phần của kháng thể nguyên vẹn gắn kết vào kháng nguyên mà kháng thể nguyên vẹn này gắn vào đó. Các ví dụ về mảnh kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, Fv, Fab, Fab', Fab'-SH, F(ab')₂; kháng thể thể đôi; kháng thể mạch thẳng; phân tử kháng thể chuỗi đơn (ví dụ, scFv); và kháng thể đa đặc hiệu được tạo ra từ các mảnh kháng thể.

Thuật ngữ kháng thể “thể khảm” dùng để chỉ kháng thể trong đó một phần của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ được lấy từ một loài hoặc nguồn cụ thể, còn phần còn lại của chuỗi nặng và/hoặc chuỗi nhẹ đó được lấy từ một loài hoặc nguồn khác.

“Lớp” của kháng thể dùng để chỉ loại miền hằng định hoặc vùng hằng định mà chuỗi nặng của nó có. Có năm lớp kháng thể chính: IgA, IgD, IgE, IgG và IgM, và một số lớp trong số này có thể được chia tiếp thành các phân lớp (isotyp), ví dụ, IgG₁, IgG₂,

IgG₃, IgG₄, IgA₁ và IgA₂. Các miền hằng định chuỗi nặng tương ứng với các lớp globulin miễn dịch khác nhau được gọi là α , δ , ϵ , γ và μ , một cách tương ứng.

Thuật ngữ “chất gây độc tế bào” trong bản mô tả này dùng để chỉ chất ức chế hoặc ngăn ngừa chức năng của tế bào và/hoặc gây chết hoặc phá hủy tế bào. Chất gây độc tế bào bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đồng vị phóng xạ (ví dụ, At²¹¹, I¹³¹, I¹²⁵, Y⁹⁰, Re¹⁸⁶, Re¹⁸⁸, Sm¹⁵³, Bi²¹², P³², Pb²¹² và các chất đồng vị phóng xạ của Lu); chất hoặc thuốc hóa trị (ví dụ, metotrexat, adriamixin, vinca alkaloid (vincristin, vinblastin, etoposid), doxorubixin, melphalan, mitomycin C, clorambuxil, daunorubixin hoặc các chất can thiệp khác); chất ức chế sinh trưởng; enzym và các mảnh của chúng như enzym phân giải axit nucleic; chất kháng sinh; độc tố như độc tố phân tử nhỏ hoặc độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc từ vi khuẩn, nấm, thực vật hoặc động vật, bao gồm các mảnh và/hoặc các biến thể của chúng; và các chất chống khối u hoặc các chất chống ung thư nêu dưới đây.

Thuật ngữ “khả năng gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement-dependent cytotoxicity)” dùng để chỉ sự phân giải tế bào cảm ứng bởi kháng thể nêu trong bản mô tả này với sự có mặt của bổ thể. Theo một phương án, CDC được đo bằng cách điều trị tế bào nội mô người biểu hiện CD19 bằng kháng thể nêu trong bản mô tả này với sự có mặt của bổ thể. Theo một phương án, tế bào này được đánh dấu bằng calcein. CDC được tìm ra khi kháng thể gây ra sự phân giải tế bào đích 20% hoặc trên 20% ở nồng độ là 30 µg/mL. Mức gắn kết vào yếu tố bổ thể C1q có thể được đo bằng phương pháp ELISA. Trong thử nghiệm này, về nguyên tắc đĩa ELISA được phủ bằng các khoảng nồng độ của kháng thể, mà C1q người hoặc huyết thanh người đã được tinh chế được bổ sung vào. Việc gắn kết với C1q được phát hiện bằng kháng thể được định hướng kháng C1q sau đó là thể liên hợp được đánh dấu peroxidaza. Việc phát hiện mức gắn kết (gắn kết tối đa Bmax) được đo dưới dạng mật độ quang ở bước sóng 405 nm (OD405) đối với cơ chất peroxidaza ABTS® (2,2'-azino-di-[3-etylbenzthiazolin-6-sulfonat (6)]).

“Chức năng tác động” dùng để chỉ các hoạt tính sinh học có thể quy cho vùng Fc của kháng thể, mà thay đổi theo lớp kháng thể. Các ví dụ về chức năng tác động của kháng thể bao gồm: gắn kết C1q và gây độc tế bào phụ thuộc bổ thể (CDC - complement-dependent cytotoxicity); gắn kết thụ thể Fc; gây độc tế bào qua trung gian tế bào phụ

thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity); thực bào; điều hòa giảm các thụ thể bề mặt tế bào (ví dụ, thụ thể tế bào B); và hoạt hóa tế bào B.

Chức năng tác động phụ thuộc sự gắn kết thụ thể Fc có thể được điều tiết bởi sự tương tác giữa vùng Fc của kháng thể với thụ thể Fc (FcR), mà là thụ thể bề mặt tế bào được đặc hiệu hóa trên tế bào sinh huyết. Thụ thể Fc thuộc siêu họ globulin miễn dịch, và đã cho thấy là điều tiết cả việc loại bỏ nguồn bệnh được phủ kháng thể bằng cách thực bào các phức hợp miễn dịch, và phân giải hồng cầu và nhiều đích tế bào khác nhau khác (ví dụ, các tế bào khối u) được phủ kháng thể tương ứng, thông qua khả năng gây độc tế bào tế bào phụ thuộc kháng thể (ADCC - antibody-dependent cellular cytotoxicity) (xem tài liệu, ví dụ, Van de Winkel, J.G. and Anderson, C.L., *J. Leukoc. Biol.* 49 (1991) 511-524). FcR được xác định bằng tính đặc hiệu của chúng đối với isotyp globulin miễn dịch: Thụ thể Fc đối với các kháng thể IgG được gọi là FcγR. Việc gắn kết thụ thể Fc được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., *Annu. Rev. Immunol.* 9 (1991) 457-492; Capel, P.J., et al., *Immunomethods* 4 (1994) 25-34; de Haas, M., et al., *J. Lab. Clin. Med.* 126 (1995) 330-341; và Gessner, J.E., et al., *Ann. Hematol.* 76 (1998) 231-248.

Sự gắn kết chéo của thụ thể đối với vùng Fc của các kháng thể IgG (FcγR) khởi phát rất nhiều chức năng tác động bao gồm thực bào, gây độc tế bào của tế bào phụ thuộc kháng thể, và giải phóng chất điều biến viêm, cũng như thanh thải phức hợp miễn dịch và điều hòa quá trình sản xuất kháng thể. Ở người, có ba lớp FcγR được mô tả đặc điểm, đó là:

- FcγRI (CD64) gắn kết IgG monome với ái lực lớn và được biểu hiện trên đại thực bào, bạch cầu đơn nhân to, bạch cầu trung tính và bạch cầu ưa eozin. Việc cải biến trong vùng Fc IgG ít nhất ở một trong các gốc axit amin E233-G236, P238, D265, N297, A327 và P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat) làm giảm khả năng gắn kết vào FcγRI. Các gốc IgG2 tại các vị trí 233-236, được thay thế thành IgG1 và IgG4, làm giảm khả năng gắn kết vào FcγRI đi khoảng 10^3 lần và loại bỏ đáp ứng bạch cầu đơn nhân người với tế bào hồng cầu đã được làm nhạy bằng kháng thể (Armour, K.L., et al., *Eur. J. Immunol.* 29 (1999) 2613-2624).
- FcγRII (CD32) gắn kết với IgG phức hợp với ái lực từ thấp đến trung bình và được biểu hiện phổ biến. Thụ thể này có thể được chia thành hai phân lớp, FcγRIIA và

FcγRIIB. FcγRIIA được phát hiện thấy ở nhiều tế bào tham gia vào quá trình tiêu diệt (ví dụ, đại thực bào, bạch cầu đơn nhân to, bạch cầu trung tính) và dường như có thể hoạt hóa quá trình tiêu diệt đó. FcγRIIB dường như có vai trò trong quá trình ức chế và được phát hiện thấy trên tế bào B, đại thực bào và dưỡng bào và bạch cầu ưa eozin. Trên tế bào B nó dường như có chức năng ức chế quá trình sản xuất globulin miễn dịch nữa và chuyển isotyp thành, ví dụ, lớp IgE. Trên đại thực bào, FcγRIIB tác động để ức chế sự thực bào như được điều tiết qua FcγRIIA. Trên bạch cầu ưa eozin và dưỡng bào, dạng B có thể hỗ trợ ức chế sự hoạt hóa các tế bào này thông qua IgE gắn kết vào thụ thể tách biệt của nó. Sự gắn kết với FcγRIIA giảm được phát hiện thấy đối với, ví dụ, kháng thể chứa vùng Fc IgG có các đột biến ít nhất ở một trong số các gốc axit amin E233-G236, P238, D265, N297, A327, P329, D270, Q295, A327, R292, và K414 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

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

Việc lập bản đồ các vị trí gắn kết trên IgG1 của người đối với các thụ thể Fc, các vị trí đột biến và các phương pháp đo khả năng gắn kết vào FcγRI và FcγRIIA được đề cập ở trên được mô tả trong tài liệu Shields, R.L., et al. J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604.

“Lượng có hiệu quả” của chất, ví dụ, dược phẩm, dùng để chỉ lượng có tác dụng, ở liều lượng và trong khoảng thời gian cần thiết, để đạt được kết quả trị liệu hoặc phòng ngừa mong muốn.

Thuật ngữ “thụ thể Fc” trong bản mô tả này dùng để chỉ thụ thể hoạt hóa được đặc trưng bởi sự có mặt của trình tự ITAM tế bào chất gắn liền với thụ thể này (xem tài liệu, ví dụ, Ravetch, J.V. and Bolland, S., Annu. Rev. Immunol. 19 (2001) 275-290). Các thụ thể này là FcγRI, FcγRIIA và FcγRIIIA. Thuật ngữ “không có sự gắn kết của

Fc γ R” để chỉ rằng ở nồng độ kháng thể là 10 μ g/mL thì mức độ gắn kết của kháng thể nêu trong bản mô tả này với tế bào NK là 10% hoặc dưới 10% so với mức độ gắn kết được phát hiện thấy đối với kháng thể kháng OX40L LC.001 như được báo cáo trong WO 2006/029879.

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

Thuật ngữ “vùng Fc” trong bản mô tả này được sử dụng để xác định vùng đầu tận C của chuỗi nặng của globulin miễn dịch mà chứa ít nhất một phần vùng hằng định. Thuật ngữ này bao gồm các vùng Fc của trình tự nguyên thể và vùng Fc biến thể. Theo một phương án, vùng Fc chuỗi nặng IgG của người kéo dài từ Cys226, hoặc từ Pro230, đến đầu tận carboxyl của chuỗi nặng. Tuy nhiên, lysin đầu tận C (Lys447) của vùng Fc này có thể có hoặc có thể không có mặt.

Kháng thể nêu trong bản mô tả này chứa vùng Fc, theo một phương án, vùng Fc này được lấy từ người. Theo một phương án, vùng Fc này chứa tất cả các phần của vùng hằng định của người. Vùng Fc của kháng thể trực tiếp tham gia vào hoạt hóa bổ thể, gắn kết C1q, hoạt hóa C3 và gắn kết thụ thể Fc. Trong khi sự ảnh hưởng của kháng thể lên hệ thống bổ thể là tùy thuộc vào các điều kiện nhất định, việc gắn kết vào C1q được gây ra bởi các vị trí gắn kết xác định trong vùng Fc. Các vị trí gắn kết này là đã biết trong tình trạng kỹ thuật và được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Lukas, T.J., et al., *J. Immunol.* 127 (1981) 2555-2560; Brunhouse, R., and Cebra, J.J., *Mol. Immunol.* 16 (1979) 907-917; Burton, D.R., et al., *Nature* 288 (1980) 338-344; Thommesen, J.E., et al., *Mol. Immunol.* 37 (2000) 995-1004; Idusogie, E.E., et al., *J. Immunol.* 164 (2000) 4178-4184;

Hezareh, M., et al., J. Virol. 75 (2001) 12161-12168; Morgan, A., et al., Immunology 86 (1995) 319-324; và EP 0 307 434. Các vị trí gắn kết này là, ví dụ, L234, L235, D270, N297, E318, K320, K322, P331 và P329 (đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Các kháng thể thuộc phân lớp IgG1, IgG2 và IgG3 thường thể hiện sự hoạt hóa bổ thể, gắn kết vào C1q và hoạt hóa C3, trong khi đó IgG4 không hoạt hóa hệ thống bổ thể, không gắn kết vào C1q và không hoạt hóa C3.

“Vùng Fc của kháng thể” là thuật ngữ đã được biết rõ với người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này và được định nghĩa trên cơ sở phân cắt kháng thể nhờ papain. Theo một phương án, vùng Fc là vùng Fc của người. Theo một phương án, vùng Fc là phân lớp IgG4 của người chứa các đột biến S228P và/hoặc L235E (đánh số theo chỉ số EU của Kabat). Theo một phương án, vùng Fc là phân lớp IgG1 của người chứa các đột biến L234A và L235A (đánh số theo chỉ số EU của Kabat).

“Khung” hoặc “FR” dùng để chỉ các gốc của miền biến đổi mà không phải là các gốc của vùng siêu biến (HVR). FR của miền biến đổi thường bao gồm bốn miền FR: FR1, FR2, FR3 và FR4. Do đó, các trình tự HVR và FR thường xuất hiện theo trình tự sau đây trong VH (hoặc VL): FR1-H1(L1)-FR2-H2(L2)-FR3-H3(L3)-FR4.

Các thuật ngữ “kháng thể có chiều dài đầy đủ”, “kháng thể nguyên vẹn” và “kháng thể toàn phần” được sử dụng trong bản mô tả này theo cách thay thế cho nhau để chỉ kháng thể có cấu trúc về cơ bản là tương tự với cấu trúc của kháng thể nguyên thể hoặc có chuỗi nặng chứa vùng Fc nêu trong bản mô tả này. “Kháng thể có chiều dài đầy đủ” là kháng thể chứa vùng biến đổi gắn kết kháng nguyên cũng như miền hằng định chuỗi nhẹ (CL) và miền hằng định chuỗi nặng, CH1, CH2 và CH3. Các miền hằng định có thể là miền hằng định trình tự nguyên thể (ví dụ, miền hằng định trình tự nguyên thể của người) hoặc các biến thể trình tự axit amin của chúng. Cụ thể hơn, kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai chuỗi nhẹ kháng thể (mỗi chuỗi nhẹ chứa miền biến đổi chuỗi nhẹ và miền hằng định chuỗi nhẹ) và hai chuỗi nặng kháng thể (mỗi chuỗi nặng chứa miền biến đổi chuỗi nặng, vùng bản lề và các miền hằng định chuỗi nặng CH1, CH2 và CH3). Các gốc axit amin đầu tận C K hoặc GK có thể có mặt hoặc không độc lập với nhau trong hai chuỗi nặng kháng thể của kháng thể có chiều dài đầy đủ.

Các thuật ngữ “tế bào chủ”, “dòng tế bào chủ” và “giống cấy tế bào chủ” được sử dụng theo cách thay thế cho nhau và dùng để chỉ tế bào trong đó axit nucleic ngoại

sinh được đưa vào, bao gồm thể hệ sau của tế bào này. Tế bào chủ bao gồm “thể biến nạp” và “tế bào biến nạp”, bao gồm tế bào biến nạp sơ cấp và thể hệ sau có nguồn gốc từ chúng, không tính đến số lần cấy chuyển. Thể hệ sau có thể không hoàn toàn giống về thành phần axit nucleic với tế bào bố mẹ mà có thể chứa đột biến. Thể hệ sau đột biến có cùng chức năng hoặc hoạt tính sinh học như được sàng lọc hoặc chọn lọc trong tế bào biến nạp ban đầu được bao gồm trong các thuật ngữ này.

“Khung liên ứng của người” là khung đại diện cho các gốc axit amin xuất hiện phổ biến nhất trong một tập hợp trình tự khung VL hoặc VH globulin miễn dịch của người. Nhìn chung, tập hợp trình tự VL hoặc VH globulin miễn dịch của người này là từ phân nhóm trình tự miền biến đổi. Thông thường, phân nhóm trình tự này là phân nhóm như nêu trong tài liệu Kabat, E.A. et al., *Sequences of Proteins of Immunological Interest*, 5th ed., Bethesda MD (1991), NIH Publication 91-3242, Vols. 1-3. Theo một phương án, đối với VL, phân nhóm này là phân nhóm kappa I như nêu trong tài liệu Kabat et al., nêu trên. Theo một phương án, đối với VH, phân nhóm này là phân nhóm III như nêu trong tài liệu Kabat et al., nêu trên.

Kháng thể “được biến đổi giống như của người” dùng để chỉ kháng thể khả chứa các gốc axit amin từ các HVR không phải của người và các gốc axit amin từ các FR của người. Theo một số phương án nhất định, kháng thể được biến đổi giống như của người chứa về cơ bản là toàn bộ ít nhất một, và thường là hai, miền biến đổi, trong đó toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ các HVR (ví dụ, CDR) đều tương ứng với các HVR (ví dụ, CDR) của kháng thể không phải của người, và toàn bộ hoặc về cơ bản là toàn bộ các FR đều tương ứng với các FR của kháng thể người. Kháng thể được biến đổi giống như của người tùy ý có thể chứa ít nhất một phần vùng hằng định của kháng thể được lấy từ kháng thể của người. “Dạng được biến đổi giống như của người” của kháng thể, ví dụ, kháng thể không phải của người, dùng để chỉ kháng thể trải qua quá trình biến đổi giống như của người.

Thuật ngữ “vùng siêu biến” hoặc “HVR”, trong bản mô tả này, dùng để chỉ mỗi trong số các vùng của miền biến đổi kháng thể chứa gốc phân đuôi axit amin mà có tính siêu biến về trình tự (“vùng quyết định tính bổ sung” hoặc “CDR”) và/hoặc tạo thành các vòng xác định về mặt cấu trúc (“vùng siêu biến”), và/hoặc chứa các gốc tiếp xúc

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

HVR bao gồm

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

Trừ khi có quy định khác, các gốc HVR và các gốc khác trong miền biến đổi (ví dụ, các gốc FR) trong bản mô tả này được đánh số theo tài liệu Kabat et al., nêu trên.

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

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

Kháng thể “đã được phân lập” là kháng thể đã được tách ra khỏi một thành phần của 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, kỹ thuật điện di (ví

dụ, SDS-PAGE, tập trung theo điểm đẳng điện (IEF), điện di mao quản) hoặc kỹ thuật sắc ký (ví dụ, HPLC trao đổi ion hoặc HPLC pha đảo). Để biết tổng quan về các phương pháp đánh giá độ tinh khiết của kháng thể, xem tài liệu, ví dụ, Flatman, S. et al., J. Chromatogr. B 848 (2007) 79-87.

Axit nucleic “đã được phân lập” dùng để chỉ phân tử axit nucleic đã được tách ra khỏi một thành phần của môi trường tự nhiên của nó. Axit nucleic đã được phân lập bao gồm phân tử axit nucleic có trong tế bào mà thường chứa phân tử axit nucleic đó, nhưng phân tử axit nucleic này có mặt bên 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 CD20 của người/thụ thể transferin của người” dùng để chỉ một hoặc nhiều phân tử axit nucleic mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ kháng thể (hoặc các mảnh của chúng), bao gồm (các) phân tử axit nucleic trong một vector duy nhất hoặc trong các vector riêng biệt, và (các) phân tử axit nucleic này có mặt tại một hoặc nhiều vị trí trong tế bào chủ.

Thuật ngữ “kháng thể đơn dòng” trong bản mô tả này dùng để chỉ kháng thể thu được từ một quần thể kháng thể gần như tương đồng, tức là, từng kháng thể riêng lẻ trong quần thể này giống nhau và/hoặc gắn kết vào cùng một epitop, ngoại trừ các biến thể kháng thể có thể có, ví dụ, chứa các đột biến có trong tự nhiên hoặc phát sinh trong quá trình tạo ra chế phẩm kháng thể đơn dòng, các biến thể này thường có mặt với lượng nhỏ. Ngược lại với chế phẩm kháng thể đa dòng, mà thường chứa các kháng thể khác nhau được định hướng kháng các yếu tố quyết định (epitop) khác nhau, mỗi kháng thể đơn dòng của chế phẩm kháng thể đơn dòng chỉ được định hướng kháng một yếu tố quyết định trên kháng nguyên. Vì vậy, từ bỏ nghĩa “đơn dòng” thể hiện đặc tính của kháng thể là thu được từ một quần thể kháng thể gần như tương đồng, và không được hiểu là cần phải tạo ra kháng thể bằng phương pháp cụ thể bất kỳ. Ví dụ, kháng thể đơn dòng được sử dụng theo sáng chế có thể được tạo ra bằng nhiều kỹ thuật khác nhau, bao gồm, nhưng không giới hạn ở, phương pháp tế bào lai, phương pháp ADN tái tổ hợp, phương pháp biểu hiện thể thực khuẩn, và phương pháp sử dụng động vật chuyển gen chứa toàn bộ hoặc một phần locus globulin miễn dịch của người, các phương pháp này và các phương pháp lấy làm ví dụ khác để tạo ra kháng thể đơn dòng được trình bày trong bản mô tả này.

“Kháng thể trần” dùng để chỉ kháng thể không được liên hợp với gốc khác loại (ví dụ, gốc gây độc tế bào) hoặc chất đánh dấu phóng xạ. Kháng thể trần có thể có mặt trong dược phẩm.

“Kháng thể nguyên thể” dùng để chỉ phân tử globulin miễn dịch có trong tự nhiên với các cấu trúc khác nhau. Ví dụ, kháng thể IgG nguyên thể là glycoprotein dị tetrame khoảng 150.000 dalton, gồm hai chuỗi nhẹ giống nhau và hai chuỗi nặng giống nhau được liên kết bằng disulfua. Từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nặng có một vùng biến đổi (VH), còn được gọi là miền nặng biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nặng, sau đó là ba miền hằng định (CH1, CH2 và CH3), theo đó nằm giữa miền hằng định thứ nhất và miền hằng định thứ hai có vùng bản lề. Tương tự, từ đầu tận N đến đầu tận C, mỗi chuỗi nhẹ có một vùng biến đổi (VL), còn được gọi là miền nhẹ biến đổi hoặc miền biến đổi chuỗi nhẹ, sau đó là một miền hằng định chuỗi nhẹ (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 cơ sở trình tự axit amin của miền hằng định của nó.

Thuật ngữ “tờ hướng dẫn sử dụng” dùng để chỉ các hướng dẫn thường được đưa vào trong các bao gói chứa sản phẩm trị liệu bán trên thị trường, chứa thông tin về chỉ định, cách sử dụng, liều lượng, cách dùng, liệu pháp kết hợp, chống chỉ định và/hoặc cảnh báo liên quan đến việc sử dụng sản phẩm trị liệu này.

“Phần trăm (%) độ đồng nhất trình tự axit amin” so với trình tự polypeptit tham chiếu được định nghĩa là phần trăm các gốc axit amin trong trình tự đang quan tâm mà giống với các gốc axit amin trong trình tự polypeptit tham chiếu, sau khi sắp hàng các trình tự này và đưa các khoảng trống vào, nếu cần, để đạt được phần trăm độ đồng nhất trình tự tối đa, và không coi bất kỳ cải biến thay thế bảo toàn nào là một phần của độ đồng nhất trình tự đó. Việc sắp hàng nhằm mục đích xác định phần trăm độ đồng nhất trình tự axit amin có thể đạt được bằng nhiều cách mà người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này đã biết, ví dụ, bằng cách sử dụng phần mềm máy tính có bán trên thị trường như phần mềm BLAST, BLAST-2, ALIGN hoặc Megalign (DNASTAR). Người có hiểu biết trung bình trong lĩnh vực này có thể xác định các thông số thích hợp để sắp hàng các trình tự, bao gồm các thuật toán bất kỳ cần để đạt được mức độ thẳng hàng tối đa trên toàn bộ chiều dài của các trình tự đang được so sánh. Tuy nhiên, đối với các mục đích trong bản mô tả này, giá trị % độ đồng nhất trình tự axit amin được tạo ra bằng

cách sử dụng chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2. Chương trình máy tính so sánh trình tự ALIGN-2 này được tạo ra bởi Genentech, Inc., và mã nguồn đã được nộp với tài liệu hướng dẫn sử dụng tại Cơ quan bản quyền Hoa Kỳ (U.S. Copyright Office), Washington D.C., 20559, được đăng ký tại đó với số đăng ký bản quyền Hoa Kỳ là TXU510087. Chương trình ALIGN-2 được bán trên thị trường bởi Genentech, Inc., South San Francisco, California, hoặc có thể được biên dịch từ mã nguồn. Chương trình ALIGN-2 nên được biên dịch để sử dụng trên hệ điều hành UNIX, bao gồm UNIX V4.0D số hóa. Tất cả các thông số so sánh trình tự đều được thiết đặt bởi chương trình ALIGN-2 và không thay đổi.

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

$$100 \text{ lần phân số } X/Y$$

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

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

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

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

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

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

Thuật ngữ “chất ức chế miễn dịch” như được sử dụng trong bản mô tả này cho liệu pháp phụ đề cập đến các chất hoạt động để ức chế hoặc che giấu hệ miễn dịch của động vật có vú đang được điều trị trong bản mô tả này. Chất này sẽ bao gồm chất ức chế

sự sản xuất xytokin, điều hòa giảm hoặc ức chế sự tự biểu hiện kháng nguyên, hoặc che giấu kháng nguyên MHC. Các ví dụ về các chất này bao gồm pyrimidin được thế 2-amino-6-aryl-5 (xem US 4665077); azathioprin; xyclophosphamit; bromcryptin; danazol; dapson; glutaraldehyt (che giấu kháng nguyên MHC, như được mô tả trong US 4120649); kháng thể kháng idiotyp đối với kháng nguyên MHC và các mảnh MHC; xyclosporin A; steroid như glucocorticosteroid, ví dụ, prednison, metylprednisolon, và dexametason; xytokin hoặc chất đối kháng thụ thể xytokin bao gồm kháng thể kháng interferon- γ , - β , hoặc - α , kháng thể kháng yếu tố hoại tử khối u α , kháng thể kháng yếu tố hoại tử khối u β , kháng thể kháng interleukin-2 và kháng thể kháng thụ thể IL-2; kháng thể kháng LFA-1, bao gồm kháng thể kháng CD11a và kháng CD18; kháng thể kháng L3T4; globulin kháng tế bào lympho khác loại; kháng thể pan-T, tốt hơn là kháng thể kháng CD3 hoặc kháng CD4/CD4a; peptit tan được chứa vùng gắn kết LFA-3 (WO 90/08187); streptokinaza; TGF- β ; streptodornaza; ARN hoặc ADN từ vật chủ; FK506; RS-61443; deoxyspergualin; rapamycin; thụ thể tế bào T (US 5114721); mảnh thụ thể tế bào T (Offner et al., Science 251 (1991) 430-432; WO 90/11294; Ianeway, Nature 341 (1989) 482; và WO 91/01133); và kháng thể thụ thể tế bào T (EP 0340109) như T10B9.

“Chất hóa trị” là hợp chất hóa học hữu ích trong điều trị ung thư. Các ví dụ về chất hóa trị bao gồm chất alkyl hóa như thiotepa và xyclophosphamit (CYTOXAN™); alkyl sulfonat như busulfan, improsulfan và piposulfan; aziridin như benzodopa, carboquon, meturedopa, và uredopa; etylenimin và metylamelamin bao gồm altretamin, trietylenmelamin, trietylenphosphoramit, trietylenthiophosphoramit và trimetylolomelamin; nitơ mù tạc như clorambuxil, clonaphazin, cholophosphamit, estramustin, ifosfamid, mecloretamin, mecloretamin oxit hydroclorua, melphalan, novembichin, phenesterin, prednimustin, trofosfamid, uraxil mù tạc; nitrosure như carmustin, clozotoxin, fotemustin, lomustin, nimustin, ranimustin; kháng sinh như aclacinomycin, actinomycin, anthramycin, azaserin, bleomycin, cactinomycin, calicheamixin, carabixin, carminomycin, carzinophilin, chromomycin, dactinomycin, daunorubicin, detorubicin, 6-diazo-5-oxo-L-norleuxin, doxorubicin, epirubicin, esorubicin, idarubicin, marxelomycin, mitomycin, axit mycophenolic, nogalamycin, olivomycin, peplomycin, potfiromycin, puromycin, quelamycin, rodorubicin, streptonigrin, streptozoxin, tuberixidin, ubenimex, zinostatin, zorubicin; chất chống

chuyển hóa như metotrexat và 5-flouraxil (5-FU); chất tương tự axit folic như denopterin, metotrexat, pteropterin, trimetrexat; chất tương tự purin như fludarabin, 6-mercaptopurin, thiamiprin, thioguanin; chất tương tự pyrimidin như anxitabin, azaxitidin, 6-azauridin, carmofur, xytarabin, dideoxyuridin, doxifluridin, enoxitabin, floxuridin, 5-FU; kích thích tố nam như calusteron, dromostanolon propionat, epitiostanol, mepitiostan, testolacton; kháng thượng thận như aminoglutethimit, mitotan, trilostan; chất độn axit folic như axit frolinic; axeglaton; aldophosphamit glycosit; axit aminolevulinic; amsacrin; bestrabuxil; bisantren; edatraxat; defofamin; demecolxin; diaziquon; elfornithin; eliptini axetat; etogluxit; gali nitrat; hydroxyure; lentinan; lonidamin; mitoguazon; mitoxantron; mopidamol; nitracrin; pentostatin; phenamet; pirarubixin; axit podophylinic; 2-etylhydrazit; procarbazin; PSK®; razoxan; sizofiran; spirogermani; axit tenuazonic; triaziquon; 2,2',2''-triclo trietylamin; uretan; vindesin; dacarbazin; mannomustin; mitobronitol; mitolactol; pipobroman; gaxytosin; arabinosit (“Ara-C”); xyclophosphamit; thiotepa; taxoit, ví dụ, paclitaxel (TAXOL®, Bristol-Myers Squibb Oncology, Princeton, N.J.) và doxetaxel (TAXOTERE®, Rhône-Poulenc Rorer, Antony, France); clorambuxil; gemxitabin; 6-thioguanin; mercaptopurin; metotrexat; chất tương tự platin như xisplatin và carboplatin; vinblastin; platin; etoposit (VP-16); ifosfamit; mitomycin C; mitoxantron; vincristin; vinorelbin; navelbin; novantron; teniposit; daunomycin; aminopterin; xeloda; ibandronat; CPT-11; chất ức chế topoisomeraza RFS 2000; diflometylornithin (DMFO); axit retinoic; esperamixin; capexitabin; và muối được dụng, axit hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất nêu trên. Cũng bao gồm trong phần định nghĩa này là các chất kháng hocmon mà hoạt động để điều hòa hoặc ức chế tác động của hocmon đến khối u như kháng estrogen bao gồm ví dụ, tamoxifen, raloxifen, aromataza ức chế 4(5)-imidazol, 4-hydroxytamoxifen, trioxifen, keoxifen, LY117018, onapriston, và toremifen (Fareston); và kháng kích thích tố nam như flutamit, nilutamit, bicalutamit, leuprolit, và goserelin; và muối được dụng, axit hoặc dẫn xuất của chất bất kỳ trong số các chất nêu trên.

II. Chế phẩm và phương pháp

Theo một khía cạnh, sáng chế dựa một phần vào kết quả rằng kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người nêu trong bản mô tả này có các đặc tính được cải thiện. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến các

kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người. Kháng thể nêu trong bản mô tả này hữu ích để, ví dụ, chẩn đoán hoặc điều trị bệnh Parkinson hoặc bệnh xơ cứng rải rác.

A. Kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người được lấy làm ví dụ

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép đã được phân lập mà gắn kết vào CD20 của người và thụ thể transferin của người. Các kháng thể này là kháng thể đặc hiệu kép gồm kháng thể lõi (chiều dài đầy đủ) và mảnh Fab được dung hợp trong đó các miền này được trao đổi chéo. Vì vậy, kháng thể đặc hiệu kép thu được là không đối xứng. Vì thế, kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách sử dụng công nghệ dị dime hóa được gọi là tra khóa vào ổ (knod-into-hole) bằng cách sử dụng chuỗi nặng thứ nhất với phần tử được gọi là đột biến khóa (HC khóa) và chuỗi nặng thứ hai với phần tử được gọi là đột biến ổ (HC ổ).

Kháng thể 0039, mà cũng là một khía cạnh của sáng chế, được cấu thành từ bốn polypeptit có trình tự axit amin là các SEQ ID NO: 06 đến 09.

Kháng thể 0039 là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong số các cặp chuỗi nặng chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và

b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu đại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu đại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin

kiểu đại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu đại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) và miền biến đổi chuỗi nặng (VH) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Kháng thể 0041, mà cũng là một khía cạnh của sáng chế, được cấu thành từ bốn polypeptit có trình tự axit amin là các SEQ ID NO: 01 đến 03 và SEQ ID NO: 10.

Kháng thể 0041 là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong số các cặp chuỗi nặng chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và

b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu đại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu đại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu đại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu đại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) và miền chuỗi nặng hằng định 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Kháng thể 0040, mà cũng là một khía cạnh của sáng chế, được cấu thành từ ba polypeptit có trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 11 đến 13 và SEQ ID NO: 22.

Kháng thể 0040 là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong các cặp chuỗi nặng chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và

b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai chứa vùng trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) và miền chuỗi nặng hằng định 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Kháng thể 0042, mà cũng là một khía cạnh của sáng chế, được cấu thành từ bốn polypeptit có trình tự axit amin của các SEQ ID NO: 14 đến 17.

Kháng thể 0042 là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) chuỗi nhẹ thứ nhất và chuỗi nặng thứ nhất thu được kháng thể thứ nhất mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ nhất; và

b) chuỗi nhẹ thứ hai và chuỗi nặng thứ hai thu được từ kháng thể thứ hai mà gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai, trong đó

trong chuỗi nhẹ thứ hai, miền hằng định CL được thay thế bởi miền hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ hai; và

trong chuỗi nặng thứ hai, miền hằng định CH1 được thay thế bởi miền hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ hai; và

i) trong đó trong vùng hằng định CL của chuỗi nhẹ thứ nhất, axit amin tại các vị trí 124 và 123 (đánh số theo Kabat) được thay thế độc lập với nhau bằng axit amin được chọn từ K, R và H; và trong đó trong vùng hằng định CH1 của chuỗi nặng thứ nhất, axit amin tại các vị trí 147 và 213 (đánh số theo EU chỉ số của Kabat) được thay thế độc lập với nhau bằng axit amin được chọn từ E hoặc D; hoặc

ii) trong đó trong vùng hằng định CL của chuỗi nặng thứ hai, axit amin tại các vị trí 124 và 123 (đánh số theo Kabat) được thay thế độc lập với nhau bằng axit amin được chọn từ K, R và H; và trong đó trong vùng hằng định CH1 của chuỗi nhẹ thứ hai, axit amin tại các vị trí 147 và 213 (đánh số theo EU chỉ số của Kabat) được thay thế độc lập với nhau bằng axit amin được chọn từ E hoặc D.

Kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này thu được bằng cách biểu hiện tạm thời trong các tế bào CHO. Hiệu suất được thể hiện trong bảng dưới đây.

Kháng thể	0039	0040	0041	0042
c [$\mu\text{g/ml}$]	8,4	25,3	32	22,5
Lượng [mg]	29,4	88,6	112,0	78,8

Sự phân bố/kết hợp khác nhau của các polypeptit tương ứng trên các plasmit biểu hiện khác nhau và các tỷ lệ khác nhau của plasmit tạo thành được sử dụng để sản xuất tái tổ hợp các kháng thể đặc hiệu kép. Các kết quả thu được trong các tế bào HEK 293 được thể hiện trong bảng dưới đây.

Kháng thể	Tỷ lệ mol plasmit		Diện tích đỉnh tương đối (không bị giảm) [%]		
			$\frac{1}{2}$ mAb ỏ	Dime chuỗi ỏ-ỏ	Kháng thể monome
0039	1:3	LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa	9	10	80
0039	1:4		6	6	88
0039	1:3:2	LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa : LC chéo	17	9	74
0039	1:4:2		10	5	85
0039	1:1:3	LC : LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa	6	6	88
0039	1:1:4		3	4	93
0040	1:3	LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa	10	18	72
0040	1:4		6	7	87
0040	1:3:2	LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa : LC chéo	5	7	89
0040	1:4:2		3	5	92
0040	1:1:3	LC : LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa	16	48	35
0040	1:1:4		6	23	69
0041	1:3	LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa	3	5	92
0041	1:4		1	2	97
0041	1:3:2	LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa : LC chéo	-	2	98
0041	1:4:2		-	1	99
0041	1:1:3	LC : LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa	-	3	97
0041	1:1:4		-	2	97
0042	1:2	LC+HC-ỏ : LC chéo+HC khóa	-	1	99

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra trong các tế bào CHO với quy mô nhỏ và sự phân bố sản phẩm phụ được phân tích sau bước tinh chế thứ nhất bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký ái lực protein A và sau bước tinh chế thứ hai bằng cách sử dụng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ điều chế. Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây.

Kháng thể	Tỷ lệ mol plasmit	Thu 3 lít lên men sau sản phẩm protein A monome (CE-SDS không có sẵn/hiệu suất)	Phân bố sản phẩm phụ (CE-SDS không có sẵn)			
			LC	HC ỏ	$\frac{1}{2}$ mAb ỏ	dime ỏ-ỏ + $\frac{3}{4}$ mAb
0039	1:3:2	55% 26 mg	16	6	11	12

Kháng thể	Tỷ lệ mol plasmit	Thu 3 lít lên men sau sản phẩm protein A monome (CE-SDS không có sẵn/hiệu suất)	Phân bố sản phẩm phụ (CE-SDS không có sẵn)			
			LC	HC ỏ	$\frac{1}{2}$ mAb ỏ	dime ỏ-ỏ + $\frac{3}{4}$ mAb
0040	1:3:2	44% 74,5 mg	23	8	7	17
0041	1:3:2	82% > 80 mg	11	0	0	7
0042	1:2	83% 68,4 mg	9	0	0	8

Kháng thể	Tỷ lệ plasmit	Thu 3 lít lên men sau protein A và sản phẩm điều chế SEC monome (CE-SDS không có sẵn/hiệu suất)	Phân bố sản phẩm phụ (CE-SDS không có sẵn)			
			LC	HC ỏ	$\frac{1}{2}$ mAb ỏ	dime ỏ-ỏ + $\frac{3}{4}$ mAb
0039	1:3:2	8,2 mg 73%	10	0	2	15
0040	1:3:2	29,7 mg 77%	10	0	0	14
0041	1:3:2	> 44 mg 79%	8	0	0	13
0042	1:2	43,6 mg > 90%	3	0	0	3

Kháng thể	Tỷ lệ plasmit	Thu 3l sau khi tinh chế protein A monome SEC	Sản phẩm phụ SEC [%]		Thành phẩm SEC	Sản phẩm phụ SEC [%]	
			HMW	LMW		HMW	LMW
0039	1:3:2	90%	2	7	95%	0	5
0040	1:3:2	89%	5	6	96,5%	1	2,5
0041	1:3:2	94%	6	0	97,5%	0,5	2
0042	1:2	95%	2	3	97%	1	2

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra trong các dòng tế bào khác nhau. Các kết quả được thể hiện trong bảng dưới đây.

Kháng thể	Vi tinh chế bằng sản phẩm protein A monome (CE-SDS)		Thu 3l sau khi tinh chế protein A monome (hiệu suất/CE-SDS không có sẵn)	Thành phẩm (tinh chế protein A điều chế và SEC điều chế) (hiệu suất/CE-SDS không có sẵn)
	CHO-K1	HEK293	CHO	CHO
0039	80%	93%	7,4 mg/l 55%	8,2 mg 73%
0040	83%	92%	21,3 mg/l 44%	29,7 mg 77%
0041	85%	99%	> 21 mg/l 82%	> 44 mg 79%
0042	91%	99%	19 mg/l 83%	43,8 mg 94%

Nhiệt độ kết tụ đối với các kháng thể 0039, 0040, 0041 và 0042 được xác định lần lượt là nhiệt độ nằm trong khoảng từ khoảng từ 54 đến 56°C, khoảng từ 50 đến 53°C, khoảng từ 51 đến 53°C, và khoảng từ 55 đến 57°C.

Toàn bộ kháng thể 0041 thể hiện các tính chất cải thiện và vì thế là khía cạnh ưu tiên của sáng chế. Các tính chất cải thiện này, trong số nhiều tính chất cải thiện khác, thuộc profin sản phẩm phụ cải thiện.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong các cặp chuỗi nặng chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và

b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu đại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu đại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai này chứa miền trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) và miền chuỗi nặng hằng định 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong số các cặp chuỗi nặng chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và

b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong các chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại axit amin; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu với kháng nguyên thứ hai này chứa vùng trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) và miền chuỗi nặng hằng định 1 (CH1) được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người,

trong đó vị trí gắn kết CD20 của người bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với trình tự axit amin SEQ ID NO: 18 và trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với trình tự axit amin SEQ ID NO: 19, và

trong đó vị trí gắn kết thụ thể transferin của người bao gồm trình tự miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với trình tự axit amin SEQ ID NO: 20 và trình tự miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có độ đồng nhất trình tự ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, 99%, hoặc 100% so với trình tự axit amin SEQ ID NO: 21.

Theo một số phương án nhất định, trình tự VH có độ đồng nhất ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các cải biến thay thế (ví dụ, thay thế bảo toàn), cài xen, hoặc làm khuyết so với trình tự tham chiếu, nhưng vị trí gắn kết chứa trình tự này vẫn giữ lại khả năng gắn kết với kháng nguyên của nó. Theo một số phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin được thay thế, cài xen và/hoặc làm khuyết trong SEQ ID NO: 18 hoặc 20. Theo một số phương án nhất định, các cải biến thay thế, cài xen, hoặc làm khuyết xuất hiện trong vùng bên ngoài vùng HVR (nghĩa là, trong FR).

Theo một số phương án nhất định, trình tự VL có độ đồng nhất ít nhất là 90%, 91%, 92%, 93%, 94%, 95%, 96%, 97%, 98%, hoặc 99% chứa các cải biến thay thế (ví dụ, thay thế bảo toàn), cài xen, hoặc làm khuyết so với trình tự tham chiếu, nhưng vị trí gắn kết chứa trình tự này vẫn giữ lại khả năng gắn kết với kháng nguyên của nó. Theo một số phương án nhất định, tổng cộng 1 đến 10 axit amin được thay thế, cài xen và/hoặc làm khuyết trong SEQ ID NO: 19 hoặc 21. Theo một số phương án nhất định, các cải biến thay thế, cài xen, hoặc làm khuyết xuất hiện trong vùng bên ngoài vùng HVR (nghĩa là, trong FR).

Theo một phương án, vị trí gắn kết CD20 của người bao gồm trình tự VH như trong SEQ ID NO: 18, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó và trình tự VL như trong SEQ ID NO: 19, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo một phương án, vị trí gắn kết thụ thể transferin của người chứa trình tự VH như trong SEQ ID NO: 20, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó và trình tự VL như trong SEQ ID NO: 21, bao gồm các cải biến sau dịch mã của trình tự đó.

Theo một phương án, kháng thể đặc hiệu kép chứa

- i) chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 01 ít nhất là 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc cao hơn,
- ii) chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 02 ít nhất là 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc cao hơn,
- iii) chuỗi nhẹ có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 03 ít nhất là 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc cao hơn, và
- iv) mảnh Fab chuỗi nặng có độ đồng nhất trình tự với SEQ ID NO: 04 ít nhất là 70%, ít nhất 80%, ít nhất 90%, hoặc 95% hoặc cao hơn,

trong đó

SEQ ID NO: 01 có trình tự axit amin

DIVMTQTPLSLPVTGPASISCRSSKSLHSNGITYLYWYLQKPGQSPQ
LLIYQMSNLSVSGVPDRFSGSGSGTDFTLKISRVEAEDVGVYYCAQNLEL
PYTFGGGGTKVEIKRTVAAPSVFIFPPSDRKLKSGTASVVCLLNNFYPREA
KVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSSTLSSTLTLSKADYEEKHKV
YACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC,

SEQ ID NO: 02 có trình tự axit amin

QVQLVQSGAEVKKPGSSVKVSCKASGYAFSYSWINWVRQAPGQGLEW
MGRIFPGDGD TDYNGKFKGRVTITADKSTSTAYMELSSLRSED TAVYY
CARNVFDGYWLVYWGQGTLVTVSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAA
LGCLVEDYFPEPVTVSWSNGAL TSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVTVPS
SSLGTQTYICNVNHKPSNTKVDEKVEPKSCDKTHTCPPCPAPEAAGGPS
VFLFPPKPKDTLMISRTPEVTCVVDVSHEDPEVKFNWYVDGVEVHNA

KTKPREEQYNSTYRVVSVLTVLHQDWLNGKEYKCKVSNKALGAPIEKT
ISKAKGQPREPQVCTLPSPRDELTKNQVSLSCAVKGFYPSDIAVEWESN
GQPENNYKTTTPVLDSGDFLVSCLTVDKSRWQQGNVFSVSMHEAL
HNHYTQKSLSLSPG,

SEQ ID NO: 03 có trình tự axit amin

AIQLTQSPSSLSASVGDRVTITCRASQSISSYLAWYQQKPGKAPKLLIYR
ASTLASGVPSRFSGSGSGTDFTLTISSLQPEDFATYYCQQNYASSNVDNT
FGGGTKVEIKSSASTKGPSVFPLAPSSKSTSGGTAALGCLVKDYFPEPVT
VSWNSGALTSGVHTFPAVLQSSGLYSLSSVVTVPSSSLGTQTYICNVNH
KPSNTKVDKKVEPKSC, và

SEQ ID NO: 04 có trình tự axit amin

QSMQESGPGLVKPSQTLSTCTVSGFSLSSYAMSWIRQHPGKGLEWIGY
IWSGGSTDYASWAKSRVTISKSTTTVSLKLSSVTAADTAVYYCARRYG
TSYPDYGDASGFDPWGQGTLLTVSSASVAAPSVFIFPPSDEQLKSGTAS
VVCLLNNFYPREAKVQWKVDNALQSGNSQESVTEQDSKDSTYSLSSTL
TLSKADYEEKHKVYACEVTHQGLSSPVTKSFNRGEC.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong số các cặp chuỗi nặng chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và

b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai này chứa miền trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) và miền chuỗi nặng hằng định 1 (CH1) được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người,

trong đó vị trí gắn kết CD20 của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19, và

trong đó vị trí gắn kết thụ thể transferin của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21.

Một khía cạnh như được báo cáo trong bản mô tả này là kháng thể đặc hiệu kép chứa

a) một kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ và chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong số các cặp chuỗi nặng chiều dài đầy đủ và chuỗi nhẹ chiều dài đầy đủ này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, trong đó kháng thể có chiều dài đầy đủ này chứa vùng Fc tạo ra bằng các polypeptit vùng Fc, mỗi polypeptit vùng Fc này chứa miền CH1, CH2 và CH3, của hai chuỗi nặng chiều dài đầy đủ, và

b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C của một chuỗi nặng của kháng thể có chiều dài đầy đủ, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung gắn kết này đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong các chuỗi nhẹ kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong các chuỗi nặng kháng thể có chiều dài đầy đủ chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) và miền chuỗi nặng hằng định 1 (CH1) được thay thế cho nhau,

trong đó kháng nguyên thứ nhất là CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferin của người,

trong đó vị trí gắn kết CD20 của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 18 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 19,

trong đó vị trí gắn kết thụ thể transferin của người chứa miền biến đổi chuỗi nặng (VH) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 20 và miền biến đổi chuỗi nhẹ (VL) có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 21, và

trong đó polypeptit vùng Fc là

- a) thuộc phân lớp IgG1 của người,
- b) thuộc phân lớp IgG4 của người,
- c) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G,
- d) thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G,
- e) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G ở cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng,
- f) thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P và P329G ở cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng,

g) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, I253A, H310A và H435A ở cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng, hoặc

h) thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T và T256E ở cả hai polypeptit vùng Fc và các đột biến T366W và S354C trong một polypeptit vùng Fc và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong polypeptit vùng Fc còn lại tương ứng, hoặc

i) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, H310A, H433A và Y436A trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng và các đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng còn lại tương ứng.

Theo một khía cạnh khác, kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người theo phương án bất kỳ trong số các phương án nêu trên có thể kết hợp dấu hiệu bất kỳ trong số các dấu hiệu như được mô tả trong các phần từ 1 đến 3 dưới đây, ở dạng đơn lẻ hoặc ở dạng kết hợp:

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

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này là kháng thể khảm. Một số kháng thể khảm nhất định được mô tả trong các tài liệu, ví dụ, US 4816567; và Morrison, S.L. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 81 (1984) 6851-6855). Trong một ví dụ, kháng thể khảm chứa vùng biến đổi không phải của người (ví dụ, vùng biến đổi được lấy từ chuột nhắt, chuột cống, chuột đồng, thỏ, hoặc động vật linh trưởng không phải là người, như khỉ) và vùng hằng định của người. Trong một ví dụ khác, kháng thể khảm là kháng thể “được chuyển lớp” trong đó lớp hoặc phân lớp đã được thay đổi so với lớp hoặc phân lớp của kháng thể bố mẹ. Kháng thể khảm bao gồm các mảnh gắn kết kháng nguyên của chúng.

Theo một số phương án nhất định, kháng 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 người, nhưng vẫn giữ

được tính đặc hiệu và ái lực của kháng thể bố mẹ không phải của người. Thông thường, kháng thể được biến đổi giống như của người chứa một hoặc nhiều miền biến đổi trong đó các HVR, ví dụ, các CDR, (hoặc các phần của chúng) được lấy từ kháng thể không phải của người, và các FR (hoặc các phần của chúng) được lấy từ các trình tự kháng thể của người. Kháng thể được biến đổi giống như của người tùy ý cũng chứa ít nhất một phần của vùng hằng định của người. Theo một số phương án, một số gốc FR trong kháng thể được biến đổi giống như của người được thay thế bằng các gốc tương ứng từ kháng thể không phải của người (ví dụ, kháng thể mà các gốc HVR được lấy từ đó), ví dụ, để khôi phục hoặc cải thiện tính đặc hiệu hoặc ái lực của kháng thể.

Các kháng thể được biến đổi giống như của người và các phương pháp tạo ra chúng được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633, và cũng được mô tả trong các tài liệu, ví dụ, Riechmann, I. et al., *Nature* 332 (1988) 323-329; Queen, C. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 86 (1989) 10029-10033; US 5821337, US 7527791, US 6982321, và US 7087409; Kashmiri, S.V. et al., *Methods* 36 (2005) 25-34 (mô tả việc ghép vùng quyết định tính đặc hiệu (SDR)); Padlan, E.A., *Mol. Immunol.* 28 (1991) 489-498 (mô tả “kỹ thuật tái tạo bề mặt”); Dall’Acqua, W.F. et al., *Methods* 36 (2005) 43-60 (mô tả “kỹ thuật xáo trộn FR”); và Osbourn, J. et al., *Methods* 36 (2005) 61-68 và Klimka, A. et al., *Br. J. Cancer* 83 (2000) 252-260 (mô tả phương pháp “chọn lọc có hướng dẫn” để làm xáo trộn FR).

Các vùng khung của người mà có thể được sử dụng trong bước biến đổi giống như của người bao gồm, nhưng không giới hạn ở: vùng khung được chọn lọc bằng cách sử dụng phương pháp “khớp tốt nhất” (xem tài liệu, ví dụ, Sims, M.J. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2296-2308; vùng khung được lấy từ trình tự liên ứng của các kháng thể người thuộc phân nhóm cụ thể của các vùng biến đổi chuỗi nhẹ hoặc chuỗi nặng (xem tài liệu, ví dụ, Carter, P. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 89 (1992) 4285-4289; và Presta, L.G. et al., *J. Immunol.* 151 (1993) 2623-2632); vùng khung thuần thực (được gây đột biến soma) của người hoặc vùng khung dòng mầm của người (xem tài liệu, ví dụ, Almagro, J.C. and Fransson, J., *Front. Biosci.* 13 (2008) 1619-1633); và vùng khung được lấy thông qua sàng lọc các thư viện FR (xem các tài liệu, ví dụ, Baca, M. et al., *J. Biol. Chem.* 272 (1997) 10678-10684 và Rosok, M.J. et al., *J. Biol. Chem.* 271 (1996) 22611-22618).

2. Kháng thể của người

Theo một số phương án nhất định, kháng thể được đề cập trong bản mô tả này là kháng thể của người. Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng nhiều kỹ thuật đã biết trong lĩnh vực này. Các kháng thể của người được mô tả chung trong tài liệu van Dijk, M.A. and van de Winkel, J.G., *Curr. Opin. Pharmacol.* 5 (2001) 368-374 và Lonberg, N., *Curr. Opin. Immunol.* 20 (2008) 450-459.

Kháng thể của người có thể được tạo ra bằng cách sử dụng chất sinh miễn dịch cho động vật chuyển gen đã được biến đổi để tạo ra kháng thể nguyên vẹn của người hoặc kháng thể nguyên vẹn có vùng biến đổi của người nhằm đáp ứng lại thách thức kháng nguyên. Động vật này thường chứa toàn bộ hoặc một phần locus globulin miễn dịch của người, thay cho locus globulin miễn dịch nội sinh, hoặc có mặt bên ngoài nhiễm sắc thể hoặc được kết hợp một cách ngẫu nhiên vào nhiễm sắc thể của động vật đó. Ở chuột nhất chuyển gen như vậy, locus globulin miễn dịch nội sinh thường bị làm bất hoạt. Để biết tổng quan về các phương pháp để thu được kháng thể của người từ động vật chuyển gen, xem tài liệu Lonberg, N., *Nat. Biotech.* 23 (2005) 1117-1125. Xem thêm trong các tài liệu, ví dụ, US 6075181 và US 6150584 mô tả công nghệ XENOMOUSE™; US 5770429 mô tả công nghệ HUMAB®; US 7041870 mô tả công nghệ K-M MOUSE® và US 2007/0061900 mô tả công nghệ VELOCIMOUSE®). Vùng

biến đổi của người từ kháng thể nguyên vẹn tạo ra bởi động vật như vậy có thể được cải biến tiếp, ví dụ, bằng cách kết hợp với vùng hằng định khác của người.

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng các phương pháp trên cơ sở tế bào lai. Dòng tế bào u tủy của người và dòng tế bào u tủy khác loại của chuột nhắt-người dùng để tạo ra kháng thể đơn dòng của người đã được mô tả. (Xem các tài liệu, ví dụ, Kozbor, D., *J. Immunol.* 133 (1984) 3001-3005; Brodeur, B.R. et al., *Monoclonal Antibody Production Techniques and Applications*, Marcel Dekker, Inc., New York (1987), pp. 51-63; và Boerner, P. et al., *J. Immunol.* 147 (1991) 86-95). Kháng thể của người được tạo ra bằng công nghệ tế bào lai tế bào B của người cũng được mô tả trong tài liệu Li, J. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 103 (2006) 3557-3562. Các phương pháp khác bao gồm các phương pháp được mô tả, ví dụ, trong tài liệu US 7189826 (mô tả việc tạo ra kháng thể IgM đơn dòng của người từ dòng tế bào lai) và trong tài liệu Ni, J., *Xiandai Mianyixue* 26 (2006) 265-268 (mô tả tế bào lai người-người). Công nghệ tế bào lai của người (công nghệ Trioma) cũng được mô tả trong tài liệu Vollmers, H.P. and Brandlein, S., *Histology and Histopathology* 20 (2005) 927-937 và Vollmers, H.P. and Brandlein, S., *Methods and Findings in Experimental and Clinical Pharmacology* 27 (2005) 185-191.

Kháng thể của người cũng có thể được tạo ra bằng cách phân lập trình tự miền biến đổi của dòng vô tính Fv được chọn lọc từ các thư viện biểu hiện thể thực khuẩn thu được từ người. Các trình tự miền biến đổi này sau đó có thể được kết hợp với miền hằng định mong muốn của người.

3. Các biến thể của kháng thể

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến biến thể trình tự axit amin của kháng thể đặc hiệu kép như được đề cập trong bản mô tả này. Ví dụ, có thể mong muốn là cải thiện ái lực gắn kết và/hoặc các tính chất sinh học khác của kháng thể. 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 cách tổng hợp peptit. Các cải biến như vậy bao gồm, ví dụ, cải biến làm khuyết và/hoặc cải biến cài xen và/hoặc cải biến thay thế các gốc trong trình tự axit amin của kháng thể. Tổ hợp bất kỳ của cải biến làm khuyết, cải biến cài xen và cải biến thay thế có thể được thực hiện để thu được cấu

trúc cuối cùng, với điều kiện là cấu trúc cuối cùng này có các đặc tính mong muốn, ví dụ, gắn kết kháng nguyên.

a) Biến thể thay thế, biến thể cài xen và biến thể làm khuyết

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể có một hoặc nhiều cải biến thay thế axit amin. Các vị trí được quan tâm để gây đột biến thay thế bao gồm HVR và FR. Các cải biến thay thế bảo toàn được thể hiện trong bảng dưới đây với tiêu đề là “cải biến thay thế ưu tiên”. Các thay đổi đáng kể hơn được trình bày trong bảng 1 với tiêu đề là “cải biến thay thế lấy làm ví dụ”, và như được mô tả thêm dưới đây liên quan đến các nhóm chuỗi bên axit amin. Cải biến thay thế axit amin có thể được đưa vào kháng thể đang quan tâm và các sản phẩm được sàng lọc về hoạt tính mong muốn, ví dụ, sự gắn kết kháng nguyên được giữ lại/cải thiện, tính sinh miễn dịch giảm, hoặc ADCC hoặc CDC cải thiện.

Bảng

Gốc ban đầu	Cải biến thay thế lấy làm ví dụ	Cải biến 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 nhóm theo các tính chất 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 gây ảnh hưởng đến sự định hướng chuỗi: Gly, Pro;
- (6) Thom: Trp, Tyr, Phe.

Các cải biến thay thế không bảo toàn sẽ phải trao đổi thành viên thuộc một trong số các lớp này cho một lớp khác.

Một loại biến thể thay thế bao gồm việc thay thế một hoặc nhiều gốc vùng siêu biến của kháng thể bố mẹ (ví dụ, kháng thể được biến đổi giống như của người hoặc kháng thể của người). Thông thường, (các) biến thể tạo thành được chọn lọc để nghiên cứu tiếp sẽ có các cải biến (ví dụ, cải thiện) về một số tính chất sinh học nhất định (ví dụ, ái lực tăng, tính sinh miễn dịch giảm) so với kháng thể bố mẹ và/hoặc về cơ bản giữ lại được một số tính chất sinh học nhất định của kháng thể bố mẹ. Biến thể thay thế tiêu biểu là kháng thể thuần thực ái lực, mà có thể được tạo ra một cách thuận lợi, ví dụ, bằng cách sử dụng các kỹ thuật làm thuần thực ái lực trên cơ sở biểu hiện thể thực khuẩn như các kỹ thuật nêu trong bản mô tả này. Một cách ngắn gọn, một hoặc nhiều gốc HVR được làm thuần thực và các biến thể kháng thể được biểu hiện trên thể thực khuẩn và được sàng lọc về hoạt tính sinh học cụ thể (ví dụ, ái lực gắn kết).

Các thay đổi (ví dụ, thay thế) có thể được tạo ra trong HVR, ví dụ, để cải thiện ái lực của kháng thể. Các thay đổi này có thể được tạo ra trong “điểm nóng” HVR, tức là, các gốc được mã hóa bởi các codon mà trải qua quá trình đột biến với tần suất cao trong quá trình thuần thực soma (xem tài liệu, ví dụ, Chowdhury, P.S., *Methods Mol. Biol.* 207 (2008) 179-196), và/hoặc các gốc tiếp xúc với kháng nguyên, và biến thể VH hoặc VL tạo thành được thử nghiệm về ái lực gắn kết. Sự thuần thực ái lực bằng cách tạo cấu trúc và chọn lọc lại từ các thư viện thứ cấp đã được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Hoogenboom, H.R. et al. in *Methods in Molecular Biology* 178 (2002) 1-37. Theo một số phương án về việc thuần thực ái lực, tính đa dạng được đưa vào các gen có khả năng biến đổi được chọn để thuần thực bằng phương pháp bất kỳ trong số nhiều phương pháp đa dạng (ví dụ, PCR dễ lỗi, xáo trộn chuỗi, hoặc gây đột biến định hướng oligonucleotit). Sau đó thư viện thứ cấp được tạo ra. Thư viện này sau đó được sàng lọc để nhận biết biến thể kháng thể bất kỳ mà có ái lực mong muốn. Một phương pháp khác để đưa tính đa dạng vào bao gồm phương pháp định hướng HVR, trong đó một vài gốc HVR (ví dụ, 4-6 gốc một lần) được chọn ngẫu nhiên. Các gốc HVR tham gia vào việc gắn kết kháng nguyên có thể được nhận biết một cách đặc hiệu, ví dụ, bằng cách sử dụng kỹ thuật lập mô hình hoặc gây đột biến quét alanin. Cụ thể, CDR-H3 và CDR-L3 thường được nhắm tới.

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

Phương pháp hữu ích để nhận biết các gốc hoặc các vùng của kháng thể mà có thể được nhắm tới để gây đột biến được gọi là “gây đột biến quét alanin” như được mô tả trong tài liệu Cunningham, B.C. and Wells, J.A., *Science* 244 (1989) 1081-1085. Trong phương pháp này, một gốc hoặc nhóm các gốc mục tiêu (ví dụ, các gốc mang điện như arg, asp, his, lys và glu) được nhận biết và thay thế bằng axit amin trung tính hoặc mang điện âm (ví dụ, alanin hoặc polyalanin) để xác định xem liệu tương tác của kháng thể với kháng nguyên có bị ảnh hưởng hay không. Các cải biến thay thế khác nữa có thể được đưa vào tại các vị trí axit amin thể hiện độ nhạy chức năng đối với các cải biến thay thế ban đầu. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, cấu trúc tinh thể của phức hợp kháng nguyên-kháng thể để nhận biết 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 loại bỏ dưới dạng ứng viên để thay thế. Các biến thể có thể được sàng lọc để xác định xem liệu chúng có chứa các tính chất mong muốn hay không.

Cải biến cài xen trình tự axit amin bao gồm đột biến dung hợp đầu tận amino và/hoặc đầu tận carboxyl có chiều dài nằm trong khoảng từ một gốc đến polypeptit chứa một trăm gốc hoặc nhiều hơn, cũng như cải biến cài xen một hoặc nhiều gốc axit amin bên trong chuỗi. Các ví dụ về cải biến cài xen đầu tận bao gồm kháng thể có gốc methionyl đầu tận N. Các biến thể cài xen khác của phân tử kháng thể bao gồm đột biến dung hợp với đầu tận N hoặc đầu tận C của kháng thể đối với enzym (ví dụ, đối với ADEPT) hoặc polypeptit làm tăng thời gian bán hủy trong huyết thanh của kháng thể.

b) Các biến thể glycosyl hóa

Theo một số phương án nhất định, kháng thể đặc hiệu kép được đề cập trong bản mô tả này được biến đổi để làm tăng hoặc giảm mức độ mà kháng thể đó được glycosyl hóa. Việc thêm vào hoặc làm khuyết đi các vị trí glycosyl hóa đối với kháng thể có thể được thực hiện một cách thuận lợi bằng cách thay đổi trình tự axit amin sao cho một hoặc nhiều vị trí glycosyl hóa được tạo ra hoặc loại bỏ.

Khi kháng thể này chứa vùng Fc, thì hydrat cacbon được gắn vào đó có thể được thay đổi. Kháng thể nguyên thể sản sinh từ tế bào động vật có vú thường chứa oligosacarit phân nhánh, hai nhánh mà thường được gắn vào Asn297 của miền CH2 của vùng Fc bằng liên kết N. Xem tài liệu, ví dụ, Wright, A. and Morrison, S.L., TIBTECH 15 (1997) 26-32. Oligosacarit có thể bao gồm nhiều hydrat cacbon khác nhau, ví dụ, mannoza, N-acetyl glucosamin (GlcNAc), galactoza, và axit sialic, cũng như fucoza gắn vào GlcNAc trong “thân” của cấu trúc oligosacarit hai nhánh. Theo một số phương án, việc cải biến oligosacarit trong kháng thể như nêu trong bản mô tả này có thể được thực hiện để tạo ra biến thể kháng thể có một số đặc tính cải thiện nhất định.

Theo một phương án, biến thể kháng thể được tạo ra có cấu trúc hydrat cacbon thiếu fucoza gắn (trực tiếp hoặc gián tiếp) vào vùng Fc. Ví dụ, lượng fucoza trong kháng thể này có thể nằm trong khoảng từ 1% đến 80%, từ 1% đến 65%, từ 5% đến 65% hoặc từ 20% đến 40%. Lượng fucoza được xác định bằng cách tính lượng fucoza trung bình bên trong chuỗi đường ở Asn297, so với tổng của toàn bộ các cấu trúc glyco gắn vào Asn 297 (ví dụ, các cấu trúc phức hợp, lai và hàm lượng mannoza cao) như được đo bằng khối phổ MALDI-TOF, như được mô tả trong WO 2008/077546 chẳng hạn. Asn297 dùng để chỉ gốc asparagin nằm ở khoảng vị trí 297 trong vùng Fc (đánh số EU các gốc trong vùng Fc); tuy nhiên, Asn297 cũng có thể nằm ở vị trí khoảng ± 3 axit amin đằng trước hoặc đằng sau vị trí 297, tức là, giữa vị trí 294 và vị trí 300, do sự thay đổi trình tự nhỏ trong kháng thể. Các biến thể fucosyl hóa này có thể cải thiện chức năng ADCC. Xem tài liệu, ví dụ, US 2003/0157108; US 2004/0093621. Các ví dụ về các tài liệu công bố liên quan đến biến thể kháng thể “được khử fucosyl” hoặc “thiếu 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; WO 2005/053742; WO 2002/031140; Okazaki, A. et al., J. Mol. Biol. 336 (2004) 1239-1249; Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622. Các ví dụ về dòng tế bào có khả năng tạo ra các kháng thể được khử fucosyl bao gồm các tế bào Lec13 CHO thiếu hụt sự fucosyl hóa protein (Ripka, J. et al., Arch. Biochem. Biophys. 249 (1986) 533-545; US 2003/0157108; và WO 2004/056312, đặc biệt ở Ví dụ 11), và các dòng tế bào bất hoạt gen, như gen alpha-1,6-fucosyltransferaza, *FUT8*, tế bào CHO bất hoạt gen (xem tài liệu, ví dụ, Yamane-Ohnuki, N. et al., Biotech. Bioeng. 87 (2004) 614-622; Kanda, Y. et al., Biotechnol. Bioeng. 94 (2006) 680-688; và WO 2003/085107).

Các biến thể kháng thể còn được bao gồm oligosacarit đã tách đôi, ví dụ, trong đó oligosacarit hai nhánh gắn vào vùng Fc của kháng thể được tách đôi bằng GlcNAc. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng fucosyl hóa giảm và/hoặc chức năng ADCC cải thiện. Các ví dụ về các biến thể kháng thể này được mô tả trong các tài liệu, ví dụ, WO 2003/011878; US 6602684; và US 2005/0123546. Sáng chế cũng đề cập đến biến thể kháng thể có ít nhất một gốc galactosa trong oligosacarit được gắn vào vùng Fc. Các biến thể kháng thể này có thể có chức năng CDC cải thiện. Các biến thể kháng thể này được mô tả trong các tài liệu, ví dụ, WO 1997/30087; WO 1998/58964; và WO 1999/22764.

c) Biến thể vùng Fc

Theo một số phương án nhất định, một hoặc nhiều cải biến axit amin có thể được đưa vào vùng Fc của kháng thể đặc hiệu kép như được đề cập trong bản mô tả này, từ đó tạo ra biến thể vùng Fc. Biến thể vùng Fc có thể chứa trình tự vùng Fc của người (ví dụ, vùng Fc IgG1, IgG2, IgG3 hoặc IgG4 của người) chứa cải biến axit amin (ví dụ, thay thế) ở một hoặc nhiều vị trí axit amin.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến biến thể kháng thể có một số nhưng không phải tất cả các chức năng tác động, mà khiến nó trở thành ứng viên mong muốn cho các ứng dụng trong đó thời gian bán hủy của kháng thể *in vivo* là chức năng tác động quan trọng nhất định (như bổ thể và ADCC) là không cần thiết hoặc có hại. Thử nghiệm khả năng gây độc tế bào *in vitro* và/hoặc *in vivo* có thể được thực hiện để khẳng định việc làm giảm/loại bỏ hoàn toàn hoạt tính CDC và/hoặc ADCC. Ví dụ, thử nghiệm gắn kết thụ thể Fc (FcR) có thể được thực hiện để đảm bảo rằng kháng thể

thiếu khả năng gắn kết Fc γ R (do đó có thể thiếu hoạt tính ADCC), nhưng vẫn giữ lại được khả năng gắn kết FcRn. Các tế bào sơ cấp để điều tiết ADCC, tế bào NK, biểu hiện Fc (chỉ RIII, trong khi đó bạch cầu đơn nhân to biểu hiện Fc γ RI, Fc γ RII và Fc γ RIII. Sự biểu hiện FcR trên tế bào sinh huyết được tóm tắt trong Bảng 3 ở trang 464 của tài liệu Ravetch, J.V. and Kinet, J.P., Annu. Rev. Immunol. 9 (1991) 457-492. Các ví dụ không nhằm giới hạn sáng chế về thử nghiệm *in vitro* để đánh giá hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm được mô tả trong các tài liệu US 5500362 (xem tài liệu, ví dụ Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 83 (1986) 7059-7063; và Hellstrom, I. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 82 (1985) 1499-1502); US 5821337 (xem tài liệu Bruggemann, M. et al., J. Exp. Med. 166 (1987) 1351-1361). Theo cách khác, phương pháp thử nghiệm không có hoạt tính phóng xạ có thể được sử dụng (xem, ví dụ, thử nghiệm về khả năng gây độc tế bào không có hoạt tính phóng xạ ACTITM để đếm tế bào theo dòng chảy (CellTechnology, Inc. Mountain View, CA; và thử nghiệm về khả năng gây độc tế bào CytoTox 96® không có hoạt tính phóng xạ (Promega, Madison, WI). Tế bào tác động hữu ích cho các thử nghiệm như vậy bao gồm tế bào máu đơn nhân ngoại vi (PBMC) và tế bào diệt tự nhiên (NK). Theo cách khác, hoặc ngoài ra, hoạt tính ADCC của phân tử đang quan tâm có thể được đánh giá *in vivo*, ví dụ, trong mô hình động vật như mô hình động vật được mô tả trong tài liệu Clynes, R. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 95 (1998) 652-656. Thử nghiệm gắn kết với C1q cũng có thể được thực hiện để khẳng định kháng thể không thể gắn kết với C1q và vì thế thiếu hoạt tính CDC. Xem, ví dụ, ELISA gắn kết C1q và C3c trong WO 2006/029879 và WO 2005/100402. Để đánh giá sự hoạt hóa bổ thể, thử nghiệm CDC có thể được thực hiện (xem tài liệu, ví dụ, Gazzano-Santoro, H. et al., J. Immunol. Methods 202 (1996) 163-171; Cragg, M.S. et al., Blood 101 (2003) 1045-1052; và Cragg, M.S. and M.J. Glennie, Blood 103 (2004) 2738-2743). Việc xác định sự gắn kết FcRn và tốc 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 này (xem tài liệu, ví dụ, Petkova, S.B. et al., Int. Immunol. 18 (2006): 1759-1769).

Các kháng thể có chức năng tác động giảm bao gồm các kháng thể có cải biến thay thế một hoặc nhiều gốc vùng Fc 238, 265, 269, 270, 297, 327 và 329 (US 6737056). Các thể đột biến Fc này bao gồm các thể đột biến Fc có các cải biến thay thế tại hai hoặc

nhiều vị trí axit amin 265, 269, 270, 297 và 327, bao gồm thể đột biến Fc được gọi là “DANA” có cải biến thay thế gốc 265 và gốc 297 thành alanin (US 7332581).

Một số biến thể kháng thể nhất định có khả năng gắn kết vào FcR cải thiện hoặc giảm đi được mô tả. (Xem các tài liệu, ví dụ, US 6737056; WO 2004/056312, và Shields, R.L. et al., J. Biol. Chem. 276 (2001) 6591-6604).

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

Theo một số phương án, các thay đổi được thực hiện trong vùng Fc mà dẫn đến sự thay đổi (tức là, cải thiện hoặc giảm bớt) khả năng gây độc tế bào gắn kết vào C1q và/hoặc phụ thuộc bổ thể (CDC - complement-dependent cytotoxicity), ví dụ, như được mô tả trong các tài liệu US 6194551, WO 99/51642, và Idusogie, E.E. et al., J. Immunol. 164 (2000) 4178-4184.

Kháng thể có thời gian bán hủy tăng và khả năng gắn kết vào thụ thể Fc mới sinh (FcRn) được cải thiện, mà chịu trách nhiệm vận chuyển IgG từ mẹ sang bào thai (Guyer, R.L. et al., J. Immunol. 117 (1976) 587-593, và Kim, J.K. et al., J. Immunol. 24 (1994) 2429-2434), được mô tả trong US 2005/0014934. Kháng thể này chứa vùng Fc có một hoặc nhiều cải biến thay thế trong đó mà cải thiện sự gắn kết của vùng Fc vào FcRn. Các biến thể Fc như vậy bao gồm các biến thể Fc có các cải biến thay thế tại một hoặc nhiều gốc vùng Fc: 238, 256, 265, 272, 286, 303, 305, 307, 311, 312, 317, 340, 356, 360, 362, 376, 378, 380, 382, 413, 424 hoặc 434, ví dụ, cải biến thể gốc vùng Fc 434 (US 7371826).

Xem thêm tài liệu Duncan, A.R. and Winter, G., Nature 322 (1988) 738-740; US 5648260; US 5624821; và WO 94/29351 liên quan đến các ví dụ khác về biến thể của vùng Fc.

d) Biến thể kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein

Theo một số phương án nhất định, có thể mong muốn là tạo ra kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein, ví dụ, “thioMAb”, trong đó một hoặc nhiều gốc của kháng thể được thay thế bằng gốc xystein. Theo các phương án cụ thể, các gốc đã được thay thế xuất hiện tại các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể. Nhờ việc thay thế các gốc

này bằng xystein, các nhóm thiol có tính phản ứng nhờ đó được định vị tại các vị trí có thể tiếp cận được của kháng thể và có thể được sử dụng để liên hợp kháng thể đó với các gốc khác, như gốc thuốc hoặc gốc thuốc-tác nhân liên kết, để tạo ra thể liên hợp miễn dịch, như được mô tả thêm trong bản mô tả này. Theo một số phương án nhất định, một hoặc nhiều gốc bất kỳ trong số các gốc sau đây có thể được thay thế bằng xystein: V205 (đánh số Kabat) của chuỗi nhẹ; A118 (đánh số EU) của chuỗi nặng; và S400 (đánh số EU) của vùng Fc chuỗi nặng. Kháng thể được xử lý kỹ thuật bằng xystein có thể được tạo ra như được mô tả trong tài liệu, ví dụ, US 7521541.

e) Dẫn xuất của kháng thể

Theo một số phương án nhất định, kháng thể đặc hiệu kép được đề cập trong bản mô tả này có thể được cải biến tiếp để chứa các gốc không chứa protein bổ sung mà đã biết trong lĩnh vực này và sẵn có. Các gốc thích hợp để tạo dẫn xuất cho kháng thể bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyme tan được trong nước. Các ví dụ không nhằm giới hạn sáng chế về polyme tan được trong nước bao gồm, nhưng không giới hạn ở, polyetylen glycol (PEG), copolyme của etylen glycol/propylen glycol, carboxymetylxenluloza, dextran, rượu polyvinyl, polyvinyl pyrrolidon, poly-1, 3-dioxolan, poly-1,3,6-trioxan, copolyme của etylen/maleic anhydrit, axit polyamin (homopolyme hoặc copolyme ngẫu nhiên), và dextran hoặc poly(n-vinyl pyrrolidon)polyetylen glycol, propylen glycol homopolyme, copolyme của propylen oxit/etylen oxit, polyol đã được polyoxyetyl hóa (ví dụ, glyxerol), rượu polyvinyl, và hỗn hợp của chúng. Polyetylen glycol propionaldehyt có thể có ưu điểm trong sản xuất nhờ tính ổn định trong nước của nó. Polyme có thể có phân tử lượng bất kỳ, và có thể được phân nhánh hoặc không được phân nhánh. Số lượng polyme gắn vào kháng thể có thể thay đổi, và nếu nhiều hơn một polyme được gắn vào, thì chúng có thể là các phân tử giống nhau hoặc khác nhau. Thông thường, số lượng và/hoặc loại polyme được sử dụng để tạo dẫn xuất có thể được xác định dựa trên các yếu tố cân nhắc bao gồm, nhưng không giới hạn ở, tính chất hoặc chức năng cụ thể của kháng thể cần được cải thiện, liệu dẫn xuất của kháng thể này có được sử dụng trong trị liệu trong các điều kiện đã xác định hay không, v.v..

Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến thể liên hợp của kháng thể và gốc không chứa protein mà có thể được làm nóng một cách chọn lọc bằng cách cho tiếp xúc

với bức xạ. Theo một phương án, gốc không chứa protein là ống nano cacbon (Kam, N.W. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 102 (2005) 11600-11605). Bức xạ có thể có bước sóng bất kỳ, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở, các bước sóng không gây hại cho các tế bào CHO bình thường, nhưng là các bước sóng làm nóng gốc không chứa protein đến nhiệt độ mà tại đó các tế bào gắn với gốc kháng thể không chứa protein bị tiêu diệt.

B. Phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm

Kháng thể có thể được tạo ra bằng cách sử dụng phương pháp tái tổ hợp và chế phẩm, ví dụ, như được mô tả trong US 4816567. Theo một phương án, sáng chế đề cập đến axit nucleic đã được phân lập mã hóa kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người nêu trong bản mô tả này. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến một hoặc nhiều vector (ví dụ, vector biểu hiện) chứa axit nucleic này. Theo một phương án khác, sáng chế đề cập đến tế bào chủ chứa axit nucleic này. Theo một phương án, tế bào chủ là tế bào nhân chuẩn, ví dụ, tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO) hoặc tế bào dạng lympho (ví dụ, tế bào Y0, NS0, Sp20). Theo một phương án, sáng chế đề cập đến phương pháp tạo ra kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người, trong đó phương pháp này bao gồm bước nuôi cấy tế bào chủ chứa axit nucleic mã hóa kháng thể, như được mô tả ở trên, trong điều kiện thích hợp để biểu hiện kháng thể, và tùy ý thu hồi kháng thể này từ tế bào chủ (hoặc môi trường nuôi cấy tế bào chủ).

Để sản xuất tái tổ hợp kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người, thì axit nucleic mã hóa kháng thể, ví dụ, như được mô tả ở trên, được phân lập và cài xen vào một hoặc nhiều vector để tiếp tục tách dòng và/hoặc biểu hiện ở tế bào chủ. Axit nucleic này có thể được phân lập và giải trình tự một cách dễ dàng bằng cách sử dụng các quy trình thông thường (ví dụ, bằng cách sử dụng mẫu dò oligonucleotit có khả năng gắn kết đặc hiệu vào các gen mã hóa chuỗi nặng và chuỗi nhẹ của kháng thể).

Các tế bào chủ thích hợp để tách dòng hoặc biểu hiện vector mã hóa kháng thể bao gồm tế bào nhân sơ hoặc tế bào nhân chuẩn nêu trong bản mô tả này. Ví dụ, kháng thể có thể được tạo ra ở vi khuẩn, đặc biệt là khi không cần đến quá trình glycosyl hóa và chức năng tác động Fc. Đối với việc biểu hiện mảnh kháng thể và polypeptit ở vi

khuẩn, xem các tài liệu, ví dụ, US 5648237, US 5789199 và US 5840523. (xem thêm tài liệu Charlton, K.A., In: *Methods in Molecular Biology*, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2003), pp. 245-254, mô tả việc biểu hiện mảnh kháng thể ở *E. coli*). Sau khi biểu hiện, kháng thể này có thể được phân lập từ tế bào vi khuẩn thể nhão trong phân đoạn tan được và có thể được tinh chế tiếp.

Ngoài sinh vật nhân sơ, vi sinh vật nhân thực như nấm sợi hoặc nấm men cũng là vật chủ tách dòng hoặc vật chủ biểu hiện thích hợp đối với vectơ mã hóa kháng thể, bao gồm bao gồm các chủng nấm và nấm men có con đường glycosyl hóa đã “được biến đổi giống như của người”, dẫn đến việc tạo ra kháng thể có mô hình glycosyl hóa của người một phần hoặc hoàn toàn. Xem tài liệu Gerngross, T.U., *Nat. Biotech.* 22 (2004) 1409-1414; và Li, H. et al., *Nat. Biotech.* 24 (2006) 210-215.

Tế bào chủ thích hợp để biểu hiện kháng thể đã được glycosyl hóa cũng được lấy từ sinh vật đa bào (động vật không xương sống và động vật có xương sống). Các ví dụ về tế bào động vật không xương sống bao gồm tế bào thực vật và tế bào côn trùng. Nhiều chủng baculovirus đã được nhận biết có thể được sử dụng kết hợp với tế bào côn trùng, đặc biệt là để chuyển nhiễm tế bào *Spodoptera frugiperda*.

Các giống cây tế bào thực vật cũng có thể được sử dụng làm vật chủ. Xem các tài liệu, ví dụ, US 5959177, US 6040498, US 6420548, US 7125978, và US 6417429 (mô tả công nghệ PLANTIBODIES™ để tạo ra kháng thể ở thực vật chuyển gen).

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 được biến đổi thích hợp để sinh trưởng trong huyền phù có thể được sử dụng. Các ví dụ khác về dòng tế bào vật chủ động vật có vú hữu ích là dòng CV1 thận khỉ được biến nạp bởi SV40 (COS-7); dòng tế bào thận phôi người (293 hoặc tế bào 293 được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Graham, F.L. et al., *J. Gen Virol.* 36 (1977) 59-74); tế bào thận chuột đồng con (BHK); tế bào Sertoli chuột nhắt (tế bào TM4 như được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Mather, J.P., *Biol. Reprod.* 23 (1980) 243-252); tế bào thận khỉ (CV1); tế bào thận khỉ xanh châu Phi (VERO-76); tế bào canxinom cổ tử cung người (HELA); tế bào thận chó (MDCK; tế bào gan chuột Buffalo (BRL 3A); tế bào phôi người (W138); tế bào gan người (Hep G2); khối u vú chuột nhắt (MMT 060562); tế bào TRI, như được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Mather, J.P. et al., *Annals N.Y. Acad. Sci.* 383 (1982) 44-68; tế bào MRC 5; và tế bào FS4. Các dòng tế bào vật

chủ động vật có vú hữu ích khác bao gồm tế bào buồng trứng chuột đồng Trung Hoa (CHO), bao gồm tế bào DHFR⁻ CHO (Urlaub, G. et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 77 (1980) 4216-4220); và dòng tế bào u tủy như Y0, NS0 và Sp2/0. Để biết tổng quan về các dòng tế bào vật chủ động vật có vú cụ thể thích hợp để tạo ra kháng thể, xem tài liệu, ví dụ, Yazaki, P. and Wu, A.M., Methods in Molecular Biology, Vol. 248, Lo, B.K.C. (ed.), Humana Press, Totowa, NJ (2004), pp. 255-268.

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

Theo một số phương án nhất định, kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người được đề cập trong bản mô tả này hữu ích để phát hiện sự có mặt của CD20 trong mẫu sinh học. Thuật ngữ “phát hiện” trong bản mô tả này bao gồm phát hiện định tính hoặc định lượng. Theo một số phương án nhất định, mẫu sinh học chứa tế bào hoặc mô.

Theo một phương án, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong phương pháp chẩn đoán hoặc phát hiện. Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp phát hiện sự có mặt của CD20 trong mẫu sinh học. Theo một số phương án nhất định, phương pháp này bao gồm bước cho mẫu sinh học tiếp xúc với kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người như được nêu trong bản mô tả này trong điều kiện cho phép kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người gắn kết với CD20, và phát hiện xem liệu có tạo ra phức hợp giữa kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người và CD20 hay không. Phương pháp này có thể là phương pháp *in vitro* hoặc *in vivo*.

Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến các kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người được đánh dấu. Chất đánh dấu bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đánh dấu hoặc gốc được phát hiện một cách trực tiếp (như chất đánh dấu huỳnh quang, chất đánh dấu sinh màu, chất đánh dấu dày đặc điện tử, chất đánh dấu phát quang và chất đánh dấu có hoạt tính phóng xạ), cũng như các gốc, như enzym hoặc phối tử, mà được phát hiện một cách gián tiếp, ví dụ, thông qua phản ứng enzym hóa hoặc tương tác phân tử. Các chất đánh dấu lấy làm ví dụ bao gồm, nhưng không giới hạn ở, chất đồng vị phóng xạ ^{32}P , ^{14}C , ^{125}I , ^3H , và ^{131}I , nhóm huỳnh quang như chelat đất hiếm hoặc florescein và dẫn xuất của nó, rhodamin và dẫn

xuất của nó, dansyl, umbelliferon, luxeriferaza, ví dụ, luxiferaza đom đóm và luxiferaza vi khuẩn (US 4737456), luxiferin, 2,3-dihydrophthalazindion, peroxidaza cải ngựa (HRP), phosphataza kiềm, β -galactosidaza, glucoamylaza, lysozym, sacarit oxidaza, ví dụ, glucoza oxidaza, galactoza oxidaza và glucoza-6-phosphat dehydrogenaza, oxidaza dị vòng như uricaza và xantin oxidaza, được cộng hợp với enzym mà sử dụng hydro peroxit để oxy hóa tiền chất thuốc nhuộm như HRP, lactoperoxidaza hoặc microperoxidaza, biotin/avidin, chất ghi nhãn spin, chất đánh dấu thể thực khuẩn, gốc tự do ổn định, và dạng tương tự.

D. Thể liên hợp miễn dịch

Sáng chế cũng mô tả thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người như được báo cáo trong bản mô tả này liên hợp với một hoặc nhiều chất gây độc tế bào, như chất hóa trị hoặc dược chất, chất ức chế sinh trưởng, độc tố (ví dụ, độc tố protein, độc tố có hoạt tính enzym có nguồn gốc vi khuẩn, nấm, thực vật, hoặc động vật, hoặc các mảnh của chúng), hoặc các đồng vị có hoạt tính phóng xạ.

Theo một phương án, thể liên hợp miễn dịch là thể liên hợp kháng thể-dược chất (ADC) trong đó kháng thể đặc hiệu kép được liên hợp với một hoặc nhiều dược chất, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở maytansinoid (xem US 5208020, US 5416064 và EP 0 425 235 B1); auristatin như các gốc dược chất monomethyl auristatin DE và DF (MMAE và MMAF) (xem US 5635483, US 5780588, và US 7498298); dolastatin; calicheamixin hoặc dẫn xuất của nó (xem US 5712374, US 5714586, US 5739116, US 5767285, US 5770701, US 5770710, US 5773001, và US 5877296; Hinman, L.M. et al., *Cancer Res.* 53 (1993) 3336-3342; và Lode, H.N. et al., *Cancer Res.* 58 (1998) 2925-2928); anthracyclin như daunomycin hoặc doxorubicin (xem Kratz, F. et al., *Curr. Med. Chem.* 13 (2006) 477-523; Jeffrey, S.C. et al., *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 16 (2006) 358-362; Torgov, M.Y. et al., *Bioconjug. Chem.* 16 (2005) 717-721; Nagy, A. et al., *Proc. Natl. Acad. Sci. USA* 97 (2000) 829-834; Dubowchik, G.M. et al., *Bioorg. & Med. Chem. Letters* 12 (2002) 1529-1532; King, H.D. et al., *J. Med. Chem.* 45 (2002) 4336-4343; và US 6630579); methotrexat; vindesin; taxan như docetaxel, paclitaxel, larotaxel, tesetaxel, và ortataxel; trichothexen; và CC1065.

Theo một phương án khác, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể đặc hiệu kép như được mô tả trong bản mô tả này liên hợp với độc tố có hoạt tính enzym hoặc mảnh của nó, bao gồm nhưng không bị giới hạn ở chuỗi A bệnh bạch hầu, các mảnh có hoạt tính không gắn kết của độc tố bệnh bạch hầu, chuỗi A exotoxin (từ *Pseudomonas aeruginosa*), chuỗi A rixin, chuỗi A abrin, chuỗi A modecxin, alpha-sarcin, protein Aleurites fordii, protein dianthin, protein Phytolacca americana (PAPI, PAPII, và PAP-S), chất ức chế Momordica charantia, curxin, crocin, chất ức chế Sapaonaria officinalis, gelonin, mitogellin, restrictoxin, phenomyxin, enomyxin, và tricothexen. Xem, ví dụ, WO 93/21232 được công bố ngày 28 tháng 10 năm 1993.

Theo một phương án khác, thể liên hợp miễn dịch chứa kháng thể đặc hiệu kép như được mô tả trong bản mô tả này liên hợp với nguyên tử có hoạt tính phóng xạ để tạo ra thể liên hợp phóng xạ. Một loạt các đồng vị có hoạt tính phóng xạ là sẵn có để sản xuất thể liên hợp phóng xạ. Các ví dụ bao gồm At^{211} , I^{131} , I^{125} , Y^{90} , Re^{186} , Re^{188} , Sm^{153} , Bi^{212} , P^{32} , Pb^{212} và các đồng vị có hoạt tính phóng xạ của Lu. Khi thể liên hợp phóng xạ được sử dụng để phát hiện, nó có thể bao gồm nguyên tử có hoạt tính phóng xạ dùng cho nghiên cứu xạ hình, ví dụ $\text{TC}^{99\text{m}}$ hoặc I^{123} , hoặc chất ghi nhãn spin để chụp hình cộng hưởng từ hạt nhân (NMR - nuclear magnetic resonance) (còn được biết đến là chụp hình cộng hưởng từ, MRI), như iot-123 lần nữa, iot-131, indi-111, flo-19, cacbon-13, nito-15, oxy-17, gadolini, mangan hoặc sắt.

Thể liên hợp của kháng thể đặc hiệu kép và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra bằng cách sử dụng một loạt chất bắt cặp hai chức như N-suxinimidyl-3-(2-pyridyldithio) propionat (SPDP), suxinimidyl-4-(N-maleimidometyl) xyclohexan-1-carboxylat (SMCC), iminothiolan (IT), dẫn xuất hai chức của imidoeste (như dimetyl adipimidat HCl), este có hoạt tính (như disuxinimidyl suberat), aldehyt (như glutaraldehyt), các hợp chất bis-azido (như bis (p-azidobenzoyl) hexanediamin), dẫn xuất bis-diazoni (như bis-(p-diazonibenzoyl)-etylendiamin), 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 chuẩn bị như được mô tả trong tài liệu Vitetta, E.S. et al., Science 238 (1987) 1098-1104. Axit 1- isothioxyanatobenzyl-3-metyldietylen triamin pentaaxetic được đánh dấu cacbon-14 (MX-DTPA) là chất tạo chelat lấy làm ví dụ để liên hợp nucleotit phóng xạ với kháng thể. Xem WO 94/11026.

Tác nhân liên kết này có thể là “tác nhân liên kết có thể phân tách” tạo điều kiện cho việc giải phóng được chất gây độc tế bào trong tế bào. Ví dụ, tác nhân liên kết không bền axit, tác nhân liên kết nhạy với peptidaza, tác nhân liên kết không bền quang, tác nhân liên kết dimetyl hoặc tác nhân liên kết chứa disulfua (Chari, R.V. et al., Cancer Res. 52 (1992) 127-131; US 5208020) có thể được sử dụng.

Thế liên hợp miễn dịch hoặc ADC trong bản mô tả này bao gồm một cách rõ ràng, nhưng không bị giới hạn ở thế liên hợp này được tạo ra bằng các thuốc thử tác nhân liên kết chéo 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 (suxinimidyl-(4-vinylsulfon)benzoat) mà có thể mua được trên thị trường (ví dụ, từ Pierce Biotechnology, Inc., Rockford, IL., U.S.A).

Thế liên hợp của kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này và một hoặc nhiều độc tố phân tử nhỏ, như calicheamixin, maytansin (US 5208020), trichothén, và CC1065 cũng được bao gồm trong bản mô tả này. Theo một phương án của sáng chế, kháng thể đặc hiệu kép được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử maytansin (ví dụ, khoảng từ 1 đến khoảng 10 phân tử maytansin trong mỗi phân tử chất đối kháng). Maytansin có thể, ví dụ, được chuyển hóa thành May-SS-Me mà có thể được khử thành May-SH3 và được phản ứng với chất đối kháng đã cải biến (Chari et al. Cancer Research 52: 127-131 (1992)) để tạo ra thế liên hợp maytansinoit-kháng thể.

Theo cách khác, kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này được liên hợp với một hoặc nhiều phân tử calicheamixin. Họ calicheamixin của kháng sinh có khả năng tạo ra ADN sợi đôi tách ra ở nồng độ dưới picomol. Chất tương tự của calicheamic về cấu trúc mà có thể được sử dụng bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, γ 1 I, α 2 I, α 3 I, N-acetyl- γ 1 I, PSAG và 0I 1 (Hinman et al. Cancer Research 53: 3336-3342 (1993) và Lode et al. Cancer Research 58: 2925-2928 (1998)).

Sáng chế còn bao gồm kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này liên hợp với hợp chất có hoạt tính phân giải nucleotit (ví dụ, ribonucleaza hoặc ADN endonucleaza như deoxyribonucleaza; DNaza).

Theo cách khác, protein dung hợp chứa kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này và chất gây độc tế bào có thể được tạo ra, ví dụ, bằng các kỹ thuật tái tổ hợp hoặc tổng hợp peptit.

E. Dược phẩm

Dược phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người như được nêu trong bản mô tả này được bào chế bằng cách trộn kháng thể này mà có mức độ tinh khiết mong muốn với một hoặc nhiều chất mang dược dụng tùy ý (Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980)), ở dạng chế phẩm được làm khô lạnh hoặc dung dịch nước. Chất mang dược dụng thường không độc đối với người nhận ở liều lượng và nồng độ được sử dụng, và bao gồm, nhưng không giới hạn ở: chất đệm như phosphat, xitrat và các axit hữu cơ khác; chất chống oxy hóa bao gồm axit ascorbic và methionin; chất bảo quản (như octadexyl dimethylbenzyl amoni clorua; hexamethoni clorua; benzalkoni clorua; benzethoni clorua; phenol, rượu butylic hoặc benzylic; alkyl paraben như metyl hoặc propyl paraben; catechol; resorxinol; xyclohexanol; 3-pentanol; và m-cresol); polypeptit có phân tử lượng thấp (ít hơn khoảng 10 gốc); protein như albumin huyết thanh, gelatin hoặc globulin miễn dịch; polyme ưa nước như poly(vinylpyrrolidon); axit amin như glyxin, glutamin, asparagin, histidin, arginin hoặc lysin; monosacarit, disacarit và các hydrat cacbon khác bao gồm glucoza, mannoza hoặc dextrin; chất tạo chelat như EDTA; đường như sucroza, mannitol, trehaloza hoặc sorbitol; đôi ion tạo muối như natri; phức kim loại (ví dụ, phức Zn-protein); và/hoặc chất hoạt động bề mặt không ion như polyetylen glycol (PEG). Các chất mang dược dụng lấy làm ví dụ trong bản mô tả này còn bao gồm chất phân tán thuốc trong kẽ như hyaluronidaza glycoprotein tan được có hoạt tính trung tính (sHASEGP), ví dụ, PH-20 hyaluronidaza glycoprotein tan được của người, như rhuPH20 (HYLENEX[®], Baxter International, Inc.). Một số sHASEGP lấy làm ví dụ và phương pháp sử dụng, bao gồm rhuPH20, được mô tả trong US 2005/0260186 và US 2006/0104968. Theo một khía cạnh, sHASEGP được kết hợp với một hoặc nhiều glycosaminoglycanaza bổ sung như chondroitinaza.

Các dược phẩm kháng thể được làm khô lạnh lấy làm ví dụ được mô tả trong US 6267958. Các dược phẩm kháng thể chứa nước bao gồm các chế phẩm được mô tả trong US 6171586 và WO 2006/044908, dược phẩm được nêu trong WO 2006/044908

chứa chất đệm histidin-axetat. Dược phẩm chứa kháng thể kháng CD20 lấy làm ví dụ như được mô tả trong WO98/56418, được kết hợp rõ ràng trong bản mô tả này bằng cách tham chiếu.

Dược phẩm được làm khô lạnh thích hợp để dùng dưới da được mô tả trong WO 97/04801. Dược phẩm được làm khô lạnh này có thể được hoàn nguyên bằng chất pha loãng thích hợp đến nồng độ protein cao và dược phẩm đã hoàn nguyên này có thể được dùng dưới da cho động vật có vú cần được điều trị trong bản mô tả này.

Dược phẩm nêu trong bản mô tả này có thể còn chứa nhiều hơn một thành phần hoạt tính khi cần đối với chỉ định cụ thể được điều trị, tốt hơn là thành phần có hoạt tính bổ sung mà không gây tác động có hại cho nhau. Các thành phần hoạt tính này có mặt một cách thích hợp ở dạng kết hợp với lượng hữu hiệu đối với mục đích dự định.

Các thành phần hoạt tính có thể được giữ trong vi nang được tạo ra, ví dụ, bằng kỹ thuật tụ giọt hoặc polyme hóa bề mặt phân cách, ví dụ, hydroxymethylxenuloza hoặc vi nang gelatin và vi nang poly-(metyl metacrylat), một cách tương ứng, trong hệ thống phân phối thuốc dạng keo (ví dụ, liposom, vi cầu albumin, vi nhũ tương, hạt nano và viên nang nano) hoặc trong đại nhũ tương. Các kỹ thuật như vậy được mô tả trong tài liệu Remington's Pharmaceutical Sciences, 16th edition, Osol, A. (ed.) (1980).

Dược phẩm giải phóng kéo dài có thể được bào chế. Các ví dụ thích hợp về dược phẩm giải phóng kéo dài bao gồm cơ chất bán thấm gồm polyme rắn kỵ nước chứa kháng thể, cơ chất này ở dạng vật phẩm được tạo hình, ví dụ, màng hoặc vi nang. Các ví dụ về cơ chất giải phóng kéo dài bao gồm polyeste, hydrogel (ví dụ, poly(2-hydroxyethyl-metacrylat), hoặc rượu poly(vinyl)), polylactit (US 3773919), copolyme của axit L-glutamic và γ etyl-L-glutamat, etylen-vinyl axetat không phân hủy, copolyme axit lactic-axit glycolic dễ phân hủy như LUPRON DEPOT™ (vi cầu tiêm được được cấu thành từ copolyme axit lactic-axit glycolic và leuprolit axetat), và axit poly-D-(-)-3-hydroxybutyric.

Dược phẩm để sử dụng *in vivo* thường là vô trùng. Tính vô trùng có thể được tạo ra dễ dàng, ví dụ, bằng cách lọc qua màng lọc vô trùng. Theo một phương án, dược phẩm là dược phẩm đẳng trương.

F. Phương pháp điều trị và chế phẩm

Kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người bất kỳ được mô tả trong bản mô tả này có thể được sử dụng trong phương pháp điều trị.

Theo một khía cạnh, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để sử dụng làm thuốc. Theo các khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong ngăn ngừa và/hoặc điều trị bệnh tăng sinh tế bào B. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong phương pháp điều trị. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong phương pháp điều trị cho cá thể mắc bệnh tăng sinh tế bào B bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, như được liệt kê dưới đây. Theo các phương án khác, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong việc làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20. Theo một số phương án nhất định, sáng chế đề cập đến kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để sử dụng trong phương pháp làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20 ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên tốt hơn là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để sản xuất hoặc bào chế thuốc. Theo một phương án, thuốc này để điều trị bệnh tăng sinh tế bào B. Theo phương án khác, thuốc này để sử dụng trong phương pháp điều trị bệnh tăng sinh tế bào B bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh liên quan đến tăng sinh tế bào B này dùng một lượng có hiệu quả của thuốc. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, như được liệt kê dưới đây. Theo một phương án khác, thuốc này để làm tiêu của tế bào B được tách ra từ não

biểu hiện CD20. Theo một phương án khác, thuốc này để sử dụng trong phương pháp làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20 ở cá thể bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của thuốc để làm tiêu tế bào B được tách ra từ não biểu hiện CD20. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên có thể là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp điều trị bệnh tăng sinh tế bào B. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể mắc bệnh tăng sinh tế bào B này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của ít nhất một chất trị liệu bổ sung, như được nêu dưới đây. “Cá thể” theo phương án bất kỳ trong số các phương án ở trên có thể là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến phương pháp làm tiêu tế bào B tuần hoàn biểu hiện CD20 ở cá thể. Theo một phương án, phương pháp này bao gồm bước cho cá thể này dùng một lượng có hiệu quả của kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người để làm tiêu tế bào B tuần hoàn biểu hiện CD20. Theo một phương án, “cá thể” là người.

Theo một khía cạnh khác, sáng chế đề cập đến dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người được đề cập trong bản mô tả này, ví dụ, để sử dụng trong phương pháp bất kỳ trong số các phương pháp trị liệu nêu trên. Theo một phương án, dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người được đề cập trong bản mô tả này và chất mang dược dụng. Theo một phương án khác, dược phẩm chứa kháng thể bất kỳ trong số các kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người được đề cập trong bản mô tả này và ít nhất một chất trị liệu bổ sung, ví dụ, như được nêu dưới đây.

Kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này có thể được sử dụng một mình hoặc kết hợp với các chất khác trong liệu pháp. Ví dụ, kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này có thể được dùng đồng thời với ít nhất một chất trị liệu bổ sung. Theo một số phương án nhất định, chất trị liệu bổ sung là chất trị liệu hiệu quả để điều trị cùng

một bệnh tăng sinh tế bào B hoặc bệnh tăng sinh tế bào B khác khi kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này được sử dụng để điều trị.

Các liệu pháp kết hợp nêu ở trên bao gồm việc sử dụng kết hợp (khi hai hoặc nhiều hơn hai chất trị liệu được bao gồm trong cùng một chế phẩm hoặc các chế phẩm tách biệt), và sử dụng riêng rẽ, trong trường hợp đó, việc sử dụng kháng thể nêu trong bản mô tả này có thể diễn ra trước, trong, và/hoặc sau khi sử dụng chất hoặc các chất trị liệu bổ sung. Theo một phương án, việc sử dụng kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người và sử dụng chất trị liệu bổ sung diễn ra trong khoảng một tháng, hoặc trong khoảng một, hai hoặc ba tuần, hoặc trong khoảng một, hai, ba, bốn, năm, hoặc sáu ngày, với nhau. Kháng thể nêu trong bản mô tả này cũng có thể được sử dụng ở dạng kết hợp với các liệu pháp can thiệp khác như, nhưng không giới hạn ở, xạ trị, liệu pháp hành vi, hoặc các liệu pháp khác đã biết trong lĩnh vực này và thích hợp cho rối loạn thần kinh cần điều trị hoặc ngăn ngừa.

Kháng thể nêu trong bản mô tả này (và chất trị liệu bổ sung bất kỳ) có thể được sử dụng theo cách thích hợp bất kỳ, bao gồm sử dụng ngoài đường tiêu hóa, trong phổi và trong mũi, và nếu cần để điều trị tại chỗ, thì sử dụng trong thương tổn. Việc truyền ngoài đường tiêu hóa bao gồm sử dụng trong cơ, trong tĩnh mạch, trong động mạch, trong màng bụng hoặc dưới da. Việc dùng liều có thể là theo đường thích hợp bất kỳ, ví dụ, bằng cách tiêm, như tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tùy thuộc một phần vào việc liệu việc sử dụng này là ngăn ngừa hay cả đời. Các lịch trình dùng liều khác nhau bao gồm, nhưng không giới hạn ở, sử dụng một lần hoặc sử dụng nhiều lần ở các thời điểm khác nhau, sử dụng thuốc liều cao (bolus) và truyền theo xung được dự tính đến trong bản mô tả này.

Ngoài ra, kháng thể đặc hiệu kép có thể được sử dụng một cách thích hợp bằng cách truyền xung, ví dụ, với liều giảm dần của kháng thể đặc hiệu kép đó. Liều này có thể được cho dùng bằng cách tiêm, tiêm trong tĩnh mạch hoặc tiêm dưới da, tùy thuộc một phần vào việc dùng ngăn ngừa hay cả đời.

Kháng thể nêu trong bản mô tả này được phối trộn, định liều và sử dụng theo cách thức phù hợp với tiêu chuẩn thực hành y tế tốt (GMP: good medical practice). Các yếu tố cần xem xét trong ngữ cảnh này bao gồm rối loạn cụ thể cần điều trị, động vật có vú cụ thể cần điều trị, tình trạng lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây ra rối

loạn, vị trí phân phối chất, phương pháp sử dụng, lịch trình sử dụng và các yếu tố khác đã biết đối với bác sĩ. Kháng thể này không cần phải, nhưng tùy ý được phối trộn với một hoặc nhiều chất hiện đang được sử dụng để ngăn ngừa hoặc điều trị rối loạn đang quan tâm. Lượng có hiệu quả của các chất khác này phụ thuộc vào lượng kháng thể có mặt trong dược phẩm, loại rối loạn hoặc điều trị, và các yếu tố khác nêu ở trên. Các chất này thường được sử dụng ở cùng liều lượng và với các đường dùng như được nêu trong bản mô tả này, hoặc khoảng từ 1 đến 99% liều lượng như nêu trong bản mô tả này, hoặc ở liều lượng bất kỳ và theo đường bất kỳ mà được xác định là thích hợp dựa vào kinh nghiệm/lâm sàng.

Các phương pháp dựa vào lipit để vận chuyển cấu trúc dung hợp hoặc hợp chất qua BBB bao gồm, nhưng không giới hạn ở, bao nang cấu trúc dung hợp hoặc hợp chất trong liposom mà có thể ghép cặp với chất gắn kết hóa trị một mà gắn kết vào thụ thể trên nội mô mạch của BBB (xem, ví dụ, US 2002/0025313), và bao chất gắn kết hóa trị một này trong các hạt lipoprotein mật độ thấp (xem, ví dụ, US 2004/0204354) hoặc apolipoprotein E (xem ví dụ, US 2004/0131692).

Để ngăn ngừa hoặc điều trị bệnh, liều lượng thích hợp của kháng thể như nêu trong bản mô tả này (khi được sử dụng ở dạng một mình hoặc kết hợp với một hoặc nhiều chất trị liệu bổ sung khác) sẽ phụ thuộc vào loại bệnh cần điều trị, loại kháng thể, mức độ trầm trọng và thời gian mắc bệnh, liệu kháng thể được sử dụng nhằm mục đích ngăn ngừa hay trị liệu, liệu pháp trị liệu đã dùng trước đó, tiền sử lâm sàng và đáp ứng của bệnh nhân với kháng thể, và quyết định của bác sĩ điều trị. Kháng thể này được sử dụng một cách thích hợp cho bệnh nhân một lần hoặc qua một đợt điều trị nhiều lần. Tùy thuộc vào loại và mức độ trầm trọng của bệnh, liều lượng kháng thể nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 15 mg/kg (ví dụ 0,5 mg/kg - 10 mg/kg) có thể là liều lượng ứng cử ban đầu để sử dụng cho bệnh nhân, dù là, ví dụ, bằng cách sử dụng riêng biệt một hoặc nhiều lần, hay bằng cách truyền liên tục. Một liều lượng hằng ngày điển hình có thể nằm trong khoảng từ 1 $\mu\text{g/kg}$ đến 100 mg/kg hoặc lớn hơn, tùy thuộc vào các yếu tố nêu ở trên. Để sử dụng lặp lại trong vài ngày hoặc lâu hơn, thì tùy vào tình trạng bệnh, việc điều trị thường sẽ được duy trì cho đến khi có được sự ức chế triệu chứng bệnh mong muốn. Một liều lượng lấy làm ví dụ của kháng thể sẽ nằm trong khoảng từ 0,05 mg/kg đến 10 mg/kg . Vì vậy, một hoặc nhiều liều khoảng 0,5 mg/kg , 2,0 mg/kg , 4,0

mg/kg hoặc 10 mg/kg (hoặc tổ hợp bất kỳ của chúng) có thể được sử dụng cho bệnh nhân. Các liều này có thể được sử dụng ngắt quãng, ví dụ, một tuần một lần hoặc ba tuần một lần (ví dụ, sao cho bệnh nhân nhận khoảng từ hai đến hai mươi hoặc, ví dụ, khoảng sáu liều kháng thể). Liều nạp ban đầu cao, sau đó là một hoặc nhiều liều thấp hơn có thể được sử dụng. Tuy nhiên, các chế độ liều lượng khác cũng có thể được sử dụng. Tiến độ của liệu pháp này được theo dõi một cách dễ dàng bằng các kỹ thuật và thử nghiệm thông dụng.

Cần phải hiểu rằng chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu bất kỳ trong số các chế phẩm hoặc phương pháp trị liệu ở trên có thể được thực hiện bằng cách sử dụng thể liên hợp miễn dịch như nêu trong bản mô tả này thay thế cho hoặc ngoài kháng thể đặc hiệu kép kháng CD20 của người/thụ thể transferin của người.

Chế phẩm chứa kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này mà gắn kết với kháng nguyên bề mặt tế bào B sẽ được phối trộn, định liều, và sử dụng theo cách phù hợp với thực tiễn y học tốt. Các yếu tố cần xem xét trong hoàn cảnh này bao gồm bệnh hoặc rối loạn cụ thể được điều trị, động vật có vú cụ thể được điều trị, tình trạng bệnh lâm sàng của từng bệnh nhân, nguyên nhân gây bệnh hoặc rối loạn, vị trí phân phối chất, phương pháp sử dụng, lịch trình sử dụng, và các yếu tố khác đã biết đối với các bác sĩ. Lượng có hiệu quả trị liệu của chất đối kháng được dùng sẽ được điều chỉnh dựa theo các yếu tố cần xem xét này.

Bên cạnh việc điều trị bệnh tăng sinh tế bào B thì kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này có thể được sử dụng để điều trị bệnh tự miễn. Các ví dụ về bệnh tự miễn hoặc các rối loạn bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở, suy giảm tiểu cầu trung gian miễn dịch, như xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát cấp tính và xuất huyết giảm tiểu cầu tự phát mạn tính, viêm da cơ, chứng múa giật Sydenham, viêm thận luput, sốt thấp khớp, hội chứng đa tuyến, xuất huyết Henoch-Schonlein, viêm thận sau liên cầu khuẩn, nốt ban đỏ, viêm động mạch Takayasu, bệnh Addison, ban đỏ đa dạng, viêm nút quanh động mạch, viêm cột sống dính khớp, hội chứng Goodpasture, viêm mạch huyết khối tắc nghẽn, xơ gan do tắc mật nguyên phát, viêm tuyến giáp Hashimoto, nhiễm độc tuyến giáp, viêm gan hoạt động mạn tính, viêm đa cơ/viêm da cơ, viêm đa sụn, pamphigut thông thường, bệnh u hạt Wegener, bệnh thận màng, bệnh xơ cứng cột bên teo cơ, bệnh giang mai biến chứng thần kinh, chứng đau đa cơ, thiếu máu ác tính, viêm

thận tiểu cầu và viêm xơ phế nang tiến triển nhanh, đáp ứng viêm như bệnh viêm da bao gồm bệnh vẩy nến và viêm da (ví dụ, viêm da dị ứng); xơ cứng bì toàn thân và xơ cứng; đáp ứng liên quan đến bệnh viêm ruột (như bệnh Crohn và viêm ruột kết mạn loét); hội chứng suy hô hấp (bao gồm hội chứng suy hô hấp người trưởng thành; ARDS); viêm da; viêm màng não; viêm não; viêm màng mạch nhỏ; viêm ruột kết; viêm thận tiểu cầu; tình trạng dị ứng như eczema và bệnh hen và các tình trạng bệnh lý khác liên quan đến sự xâm nhập của các tế bào T và đáp ứng viêm mạn tính; xơ vữa động mạch; thiếu hụt kết dính bạch cầu; viêm khớp dạng thấp; luput ban đỏ toàn thân (SLE); bệnh đái tháo đường (ví dụ, bệnh đái tháo đường typ I hoặc bệnh đái tháo đường phụ thuộc insulin); bệnh xơ cứng rải rác; hội chứng Reynaud; viêm tuyến giáp tự miễn; viêm não và dây cột sống do dị ứng; hội chứng Sjogren; bệnh đái tháo đường khởi phát ở tuổi vị thành niên; và đáp ứng miễn dịch liên quan đến tính quá mẫn cấp tính và bị trì hoãn điều tiết bởi xytokin và tế bào lympho T thường được thấy ở bệnh lao, bệnh sarcoit, viêm đa cơ, bệnh u hạt và viêm mạch; bệnh thiếu máu ác tính (bệnh Addison); bệnh liên quan đến xuyên mạch bạch cầu; rối loạn viêm hệ thần kinh trung ương (CNS); hội chứng tổn thương đa cơ quan; chứng thiếu máu tan máu (bao gồm, nhưng không bị giới hạn ở chứng cryoglobulin huyết hoặc chứng thiếu máu dương tính với nghiệm pháp Coombs); bệnh nhược cơ; bệnh điều tiết bởi phức chất kháng nguyên-kháng thể; bệnh kháng màng đáy cầu thận; hội chứng kháng phospholipit; viêm dây thần kinh dị ứng; bệnh Graves; hội chứng nhược cơ Lambert-Eaton; bong pemphigut; pemphigut thông thường; bệnh đa nội tiết tự miễn; bệnh Reiter; hội chứng cứng người; bệnh Bechet; viêm động mạch tế bào khổng lồ; viêm thận phức hợp miễn dịch; bệnh thận IgA; bệnh đa dây thần kinh IgM; xuất huyết giảm tiểu cầu miễn dịch (ITP - immune thrombocytopenic purpura) hoặc giảm tiểu cầu tự miễn v.v.. Theo khía cạnh này của sáng chế, ABM theo sáng chế được sử dụng để làm tiêu máu của tế bào B bình thường trong thời gian kéo dài.

Tuy nhiên, như được lưu ý ở trên, các lượng được đề xuất của kháng thể đặc hiệu kép này đề cập đến ý tưởng tuyệt vời về sự thận trọng trong trị liệu. Yếu tố chính trong việc chọn liều và lịch trình dùng liều thích hợp là kết quả thu được, như được chỉ ra ở trên. Ví dụ, liều tương đối cao hơn có thể được yêu cầu ngay từ đầu để điều trị cho bệnh đang tiến triển và bệnh cấp tính. Để thu được kết quả có hiệu quả nhất, thì tùy vào bệnh hoặc rối loạn, chất đối kháng được sử dụng gần nhất có thể với dấu hiệu, chẩn đoán, sự

xuất hiện, hoặc xảy ra đầu tiên của bệnh hoặc rối loạn hoặc trong thời gian thuyên giảm của bệnh hoặc rối loạn.

Bên cạnh việc sử dụng kháng thể được phân lập đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này cho bệnh nhân thì sáng chế còn bao gồm việc dùng kháng thể đặc hiệu kép này bằng liệu pháp gen. Việc dùng axit nucleic mã hóa kháng thể đặc hiệu kép được bao hàm trong cụm từ “dùng lượng có hiệu quả trị liệu của kháng thể đặc hiệu kép”. Xem, ví dụ, WO96/07321 liên quan đến việc sử dụng liệu pháp gen để tạo ra kháng thể nội bào.

Có hai phương pháp tiếp cận chính để đưa axit nucleic (tùy ý được chứa trong vector) vào các tế bào của bệnh nhân; *in vivo* và *ex vivo*. Để phân phối *in vivo*, axit nucleic được tiêm trực tiếp vào bệnh nhân, thường là ở vị trí mà kháng thể đặc hiệu kép được yêu cầu. Đối với điều trị *ex vivo*, các tế bào của bệnh nhân được loại bỏ, axit nucleic được đưa vào các tế bào đã được phân lập này và các tế bào đã được cải biến được cho bệnh nhân dùng trực tiếp hoặc, ví dụ, được bao nang trong màng xốp đã được cấy vào bệnh nhân (xem, ví dụ US 4892538 và US 5283187). Có nhiều kỹ thuật khác nhau sẵn có để đưa axit nucleic vào trong các tế bào sống. Các kỹ thuật này thay đổi tùy thuộc vào việc liệu axit nucleic được chuyển vào các tế bào đã nuôi cấy *in vitro*, hay *in vivo* trong các tế bào của vật chủ được dự định. Các kỹ thuật thích hợp để chuyển axit nucleic vào các tế bào động vật có vú *in vitro* bao gồm sử dụng liposom, điện hóa, vi tiêm, dung hợp tế bào, DEAE-dextran, phương pháp kết tủa canxi phosphat, v.v.. Vector được sử dụng phổ biến để phân phối *ex vivo* gen này là retrovirus.

Các kỹ thuật truyền axit nucleic *in vivo* được ưu tiên hiện nay bao gồm chuyển nhiễm bằng vector virus (như adenovirus, virus Herpes đơn giản loại I, hoặc virus adenovirus liên hợp) và hệ thống gốc lipid (lipid hữu ích để chuyển gen qua trung gian lipid là DOTMA, DOPE và DC-Chol chẳng hạn). Trong một số trường hợp, mong muốn là tạo ra nguồn axit nucleic bằng chất hướng đích các tế bào đích, như kháng thể đặc hiệu protein màng bề mặt tế bào hoặc tế bào đích, phối tử đối với thụ thể trên tế bào đích, v.v.. Khi liposom được sử dụng, protein gắn kết với protein màng bề mặt tế bào liên quan đến quá trình nhập bào có thể được sử dụng để hướng đích và/hoặc để tạo điều kiện cho việc hấp thụ, ví dụ, protein capsit hoặc các mảnh của nó hướng kích thích đối với kiểu tế bào cụ thể, kháng thể đối với protein trải qua sự nhập vòng, và protein hướng

đích sự định vị nội bào và tăng cường thời gian bán hủy nội bào. Kỹ thuật để nhập bào qua trung gian thụ thể được mô tả trong tài liệu, ví dụ, Wu et al., J. Biol. Chem. 262:4429-4432 (1987); và Wagner et al., Proc. Natl. Acad. Sci. USA 87:3410-3414 (1990). Để biết tổng quan về phương pháp chỉ thị gen hiện đã biết và các quy trình liệu pháp gen, xem tài liệu Anderson et al., Science 256:808-813 (1992). Xem thêm WO 93/25673 và các tài liệu tham khảo được trích dẫn trong đó.

Các kỹ thuật thông thường để liên hợp các chất trị liệu bổ sung với kháng thể đã được biết đến (xem tài liệu, ví dụ, Arnon et al., "Monoclonal Antibodies for Immunotargeting of Drugs in Cancer Therapy", trong Monoclonal Antibodies and Cancer Therapy, Reisfeld et al. (eds.), pp. 243-56 (Alan R. Liss, Inc. 1985); Hellstrom et al., "Antibodies For Drug Delivery", trong Controlled Drug Delivery (2nd Ed.), Robinson et al. (eds.), pp. 623-53 (Marcel Dekker, Inc. 1987); Thorpe, "Antibody Carriers of Cytotoxic Agents In Cancer Therapy: A Review", trong Monoclonal Antibodies '84: Biological and Clinical Applications, Pinchera et al. (eds.), pp. 475-506 (1985); và Thorpe et al., "The Preparation and Cytotoxic Properties Of Antibody-Toxin Conjugates", Immunol. Rev., 62 (1982) 119-58).

III. Vật phẩm sản xuất

Theo một khía cạnh khác như được báo cáo trong bản mô tả này, sáng chế đề cập đến vật phẩm sản xuất chứa các nguyên liệu hữu ích để điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán các rối loạn ở trên. Vật phẩm sản xuất chứa vật chứa và nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng nằm trên hoặc gắn liền với vật chứa. Các vật chứa thích hợp bao gồm, ví dụ, chai, lọ, bơm tiêm, túi đựng dung dịch dùng trong tĩnh mạch, v.v.. Vật chứa có thể được tạo ra từ các vật liệu khác nhau như thủy tinh hoặc chất dẻo. Vật chứa đựng chế phẩm, mà bản thân nó hoặc kết hợp với một chế phẩm khác có hiệu quả trong việc điều trị, ngăn ngừa và/hoặc chẩn đoán tình trạng bệnh lý, và có thể có cổng vào vô trùng (ví dụ, vật chứa có thể là túi đựng dung dịch dùng trong tĩnh mạch hoặc lọ có nút đậy có thể chọc thủng bằng kim tiêm dưới da). Ít nhất một hoạt chất trong chế phẩm này là kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này. Nhãn hoặc tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm này được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý được lựa chọn. Ngoài ra, vật phẩm sản xuất có thể chứa (a) vật chứa thứ nhất chứa chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này chứa kháng thể như được báo cáo trong bản mô tả này; và (b) vật chứa

thứ hai chứa chế phẩm trong đó, trong đó chế phẩm này chứa chất gây độc tế bào khác hoặc chất trị liệu khác. Vật phẩm sản xuất theo phương án này có thể còn chứa tờ hướng dẫn sử dụng thể hiện rằng chế phẩm này có thể được sử dụng để điều trị tình trạng bệnh lý cụ thể. Theo cách khác, hoặc ngoài ra, vật phẩm sản xuất có thể còn chứa vật chứa thứ hai (hoặc thứ ba) chứa chất đệm được dụng, như nước kìm khuẩn dùng cho tiêm (BWFI – bacteriostatic water for injection), nước muối đệm phosphat, dung dịch Ringer và dung dịch dextroza. Nó có thể còn bao gồm các nguyên liệu khác được mong muốn xét theo quan điểm thương mại và quan điểm người sử dụng, bao gồm các chất đệm khác, chất pha loãng, chất độn, kim tiêm và bơm tiêm.

Cần phải hiểu rằng vật phẩm sản xuất bất kỳ trong số các vật phẩm sản xuất ở trên có thể chứa thể liên hợp miễn dịch như được báo cáo trong bản mô tả này thay thế cho hoặc ngoài kháng thể đặc hiệu kép như được báo cáo trong bản mô tả này.

Ví dụ thực hiện sáng chế

Dưới đây là các ví dụ về phương pháp và chế phẩm theo sáng chế. Cần phải hiểu rằng nhiều phương án khác nhau khác có thể được thực hiện dựa vào phần mô tả chung nêu trên.

Vật liệu & phương pháp tổng quát

Thông tin tổng quát liên quan đến trình tự nucleotit của chuỗi nhẹ và chuỗi nặng globulin miễn dịch của người được nêu trong tài liệu: Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991). Axit amin của các chuỗi kháng thể được đánh số và viện dẫn theo cách đánh số theo Kabat (Kabat, E.A., et al., Sequences of Proteins of Immunological Interest, 5th ed., Public Health Service, National Institutes of Health, Bethesda, MD (1991)).

Kỹ thuật ADN tái tổ hợp

Các phương pháp chuẩn được sử dụng để thao tác trên ADN như được mô tả trong tài liệu Sambrook, J. et al., Molecular Cloning: A laboratory manual; Cold Spring Harbor Laboratory Press, Cold Spring Harbor, New York, 1989. Chất phản ứng sinh học phân tử được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất.

Tổng hợp gen

Các đoạn gen mong muốn được tạo ra từ oligonucleotit được tạo ra bằng cách tổng hợp hóa học. Các đoạn gen dài, có bên sườn là các vị trí phân cắt endonucleaza giới hạn đơn, được lắp ráp bằng cách ghép và nối các oligonucleotit bao gồm khuếch đại PCR và sau đó được tách dòng qua các vị trí giới hạn được chỉ định này. Các trình tự ADN của các đoạn gen đã tái tạo dòng thuần được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Các đoạn gen tổng hợp được xếp thứ tự theo mô tả cho trước tại Geneart (Regensburg, Đức).

Xác định trình tự ADN

Các trình tự ADN được xác định bằng cách giải trình tự sợi kép được thực hiện ở MediGenomix GmbH (Martinsried, Đức) hoặc SequiServe GmbH (Vaterstetten, Đức).

ADN và phân tích trình tự protein và quản lý dữ liệu trình tự

Gói phần mềm GCG (Genetics Computer Group, Madison, Wisconsin) phiên bản 10.2 và Infomax's Vector NT1 Advance suite phiên bản 8.0 được sử dụng để tạo ra, lập bản đồ, phân tích, chú thích và minh họa trình tự.

Vectơ biểu hiện

Để biểu hiện kháng thể đặc hiệu kép mong muốn, plasmit biểu hiện để biểu hiện tạm thời (ví dụ, trong tế bào HEK293) dựa trên tổ chức cADN có hoặc không có gen khởi đầu CMV-intron A hoặc dựa trên tổ chức bộ gen với vùng khởi đầu CMV có thể được áp dụng.

Ngoài cat-xet biểu hiện kháng thể thì các vectơ này chứa:

- gốc sao chép cho phép sao chép plasmit này trong E. coli, và
- gen β -lactamaza tạo tính kháng ampicillin ở E. coli.

Đơn vị phiên mã của gen kháng thể được cấu thành từ các thành phần sau:

- (các) vị trí giới hạn đặc thù ở đầu 5'
- yếu tố tăng cường sớm tức thì và gen khởi đầu từ cytomegalovirut của người,
- trình tự intron A trong trường hợp tổ chức cADN,
- vùng không dịch mã ở đầu 5' lấy từ gen kháng thể của người,
- trình tự tín hiệu chuỗi nặng globulin miễn dịch,
- axit nucleic mã hóa chuỗi kháng thể tương ứng dưới dạng cADN hoặc có tổ chức exon-intron bộ gen,
- vùng không dịch mã ở đầu 3' với trình tự tín hiệu polyadenyl hóa,
- trình tự gen kết thúc, và
- (các) vị trí giới hạn đặc thù ở đầu 3'.

Gen dung hợp mã hóa các chuỗi kháng thể được tạo ra bằng phương pháp PCR và/hoặc tổng hợp gen và được lắp ráp bằng phương pháp và kỹ thuật tái tổ hợp đã biết bằng cách nối các đoạn axit nucleic tương ứng, ví dụ, bằng cách sử dụng các vị trí giới

hạn đặc thù trong các vector tương ứng. Các trình tự axit nucleic đã tái tạo dòng thuần được xác nhận bằng cách giải trình tự ADN. Để chuyển nhiễm tạm thời thì plasmit với lượng lớn hơn được tạo ra bằng chế phẩm plasmit từ giống cây *E. coli* biến nạp (Nucleobond AX, Macherey-Nagel).

Đối với tất cả các cấu trúc, công nghệ di dime hóa tra khóa vào ổ (knob-into-hole) được sử dụng với cải biến thay thế khóa thông thường (T366W) trong miền CH3 thứ nhất và cải biến thay thế ổ tương ứng (T366S, L368A và Y407V) trong miền CH3 thứ hai (cũng như hai gốc xystein được đưa vào bổ sung S354C/Y349'C) (chứa trong trình tự chuỗi nặng (HC) tương ứng được mô tả ở trên).

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào

Kỹ thuật nuôi cấy tế bào chuẩn như được mô tả trong tài liệu Current Protocols in Cell Biology (2000), Bonifacino, J.S., Dasso, M., Harford, J.B., Lippincott-Schwartz, J. and Yamada, K.M. (eds.), John Wiley & Sons, Inc., được sử dụng.

Chuyển nhiễm tạm thời trong hệ thống HEK293-F

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra bằng cách biểu hiện tạm thời. Vì thế quá trình chuyển nhiễm với plasmit tương ứng bằng cách sử dụng hệ thống HEK293-F (Invitrogen) theo hướng dẫn của nhà sản xuất được thực hiện. Một cách ngắn gọn, tế bào HEK293-F (Invitrogen) sinh trưởng trong huyền phù trong bình lắc hoặc trong thiết bị lên men có khuấy trong môi trường biểu hiện FreeStyle™ 293 không huyết thanh (Invitrogen) được chuyển nhiễm với hỗn hợp của plasmit biểu hiện tương ứng và 293fectin™ hoặc fectin (Invitrogen). Đối với bình lắc dung tích 2 L (Corning), các tế bào HEK293-F được gieo ở mật độ $1,0 \times 10^6$ tế bào/mL trong 600 mL và được ủ ở tốc độ 120 vòng/phút, CO₂ 8%. Vào ngày tiếp theo, các tế bào này được chuyển nhiễm ở mật độ tế bào khoảng $1,5 \times 10^6$ tế bào/mL với xấp xỉ 42 mL hỗn hợp của A) 20 mL môi trường Opti-MEM (Invitrogen) chứa 600 µg tổng cộng ADN plasmit (1 µg/mL) và B) 20ml môi trường Opti-MEM được bổ sung 1,2 mL 293 fectin hoặc fectin (2 µL/mL). Theo mức tiêu thụ glucoza, dung dịch glucoza được bổ sung trong thời gian lên men. Phần dịch nổi trên bề mặt chứa kháng thể đã tiết ra được thu hoạch sau 5-10 ngày và kháng thể được tinh chế trực tiếp từ phần dịch nổi trên bề mặt hoặc phần dịch nổi trên bề mặt này được đông lạnh và lưu giữ.

Xác định protein

Nồng độ protein của các kháng thể được tinh chế và các dẫn xuất được xác định bằng cách xác định mật độ quang (OD) ở bước sóng 280 nm, bằng cách sử dụng hệ số hấp thụ mol được tính trên cơ sở trình tự axit amin theo Pace, et al., Protein Science 4 (1995) 2411-1423.

Xác định nồng độ kháng thể trong phần dịch nổi trên bề mặt

Nồng độ của các kháng thể và các dẫn xuất trong phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được ước lượng bằng cách kết tủa miễn dịch với các hạt protein A agaroza (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức). Vì thế, 60 μ L hạt protein A Agaroza được rửa ba lần trong TBS-NP40 (chất đệm Tris 50 mM, độ pH=7,5, được bổ sung NaCl 150 mM và Nonidet-P40 1%). Sau đó, 1-15 mL phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được đưa lên các hạt protein A Agaroza được cân bằng trước trong TBS-NP40. Sau khi ủ trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng thì các hạt này được rửa trên cột lọc Ultrafree-MC (Amicon) một lần bằng 0,5mL TBS-NP40, hai lần bằng 0,5 mL 2x nước muối được đệm phosphat (2xPBS, Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức) và bốn lần nhanh bằng 0,5mL chất đệm Na-xitrat 100 mM (độ pH = 5,0). Kháng thể đã gắn kết được rửa giải bằng cách thêm 35 μ L chất đệm mẫu NuPAGE® LDS (Invitrogen). Một nửa mẫu được kết hợp với chất khử mẫu NuPAGE® hoặc được để yên không khử, một cách tương ứng, và được làm nóng trong 10 phút ở nhiệt độ 70°C. Sau đó, 5-30 μ L được đưa lên gel NuPAGE® 4-12% Bis-Tris SDS-PAGE (Invitrogen) (với chất đệm MOPS đối với SDS-PAGE không được khử và chất đệm MES có chất phụ gia đệm chạy mẫu chống oxy hóa NuPAGE® (Invitrogen) đối với SDS-PAGE được khử) và được nhuộm bằng Coomassie Blue.

Nồng độ của kháng thể trong phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được định lượng bằng phương pháp sắc ký ái lực HPLC. Một cách ngắn gọn, phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào chứa kháng thể mà gắn kết vào protein A được đưa lên cột Applied Biosystems Poros A/20 trong KH_2PO_4 200 mM, natri xitrat 100 mM, độ pH=7,4 và được rửa giải bằng NaCl 200 mM, axit xitric 100 mM, độ pH=2,5 trên hệ thống Agilent HPLC 1100. Kháng thể đã rửa giải được định lượng bằng độ hấp thụ UV và tích phân của các diện tích đỉnh. Kháng thể IgG1 tiêu chuẩn đã tinh chế được sử dụng làm chất chuẩn.

Theo cách khác, nồng độ của các kháng thể và các dẫn xuất trong phần dịch nổi trên bề mặt cấy tế bào được đo bằng phương pháp IgG-ELISA dạng sandwich. Một cách ngắn gọn, các đĩa vi chuẩn 96 giếng StreptaWell High Bind Streptavidin A (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim, Đức) được phủ 100 μ L/giếng phân tử bất kháng thể kháng IgG của người được biotinyl hóa F(ab')₂-h-Fc γ BI (Dianova) ở nồng độ 0,1 μ g/mL trong 1 giờ ở nhiệt độ trong phòng hoặc theo cách khác là để qua đêm ở nhiệt độ 4°C và sau đó rửa ba lần bằng 200 μ L/giếng PBS, Tween 0,05% (PBST, Sigma). Sau đó, 100 μ L/giếng dãy pha loãng trong PBS (Sigma) của phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào chứa kháng thể tương ứng được thêm vào các giếng và được ủ trong 1-2 giờ trên máy lắc ở nhiệt độ trong phòng. Các giếng này được rửa ba lần bằng PBST với lượng 200 μ L/giếng và kháng thể đã gắn kết được phát hiện bằng 100 μ L F(ab')₂-h-Fc γ -POD (Dianova) ở nồng độ 0,1 μ g/mL dưới dạng kháng thể phát hiện bằng cách ủ trong 1-2 giờ trên máy lắc ở nhiệt độ trong phòng. Kháng thể phát hiện không gắn kết được loại bỏ bằng cách rửa ba lần bằng PBST với lượng 200 μ L/giếng. Kháng thể phát hiện không gắn kết này được phát hiện bằng cách thêm 100 μ L ABTS/giếng sau đó là ủ. Việc xác định độ hấp thụ được thực hiện trên thiết bị đo phổ Tecan Fluor ở bước sóng đo là 405 nm (bước sóng tham chiếu là 492 nm).

Tinh chế kháng thể điều chế

Các kháng thể được tinh chế từ phần dịch nổi trên bề mặt nuôi cấy tế bào được lọc dựa trên quy trình chuẩn. Nói một cách ngắn gọn, các kháng thể được đưa lên cột protein A Sepharose (GE healthcare) và được rửa bằng PBS. Việc rửa giải các kháng thể đạt được ở độ pH=2,8 sau đó trung hòa ngay lập tức. Protein kết tụ được tách khỏi các kháng thể monome bằng phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ (Superdex 200, GE Healthcare) trong PBS hoặc trong chất đệm Histidin 20 mM chứa NaCl 150 mM (độ pH=6,0). Các phân đoạn kháng thể monome được gộp lại, được cô (nếu cần) bằng cách sử dụng, ví dụ, thiết bị cô ly tâm MILLIPORE Amicon Ultra (30 MWCO), được đông lạnh và lưu trữ ở nhiệt độ -20°C hoặc -80°C. Một phần mẫu được cung cấp cho quá trình phân tích protein sau đó và xác định đặc điểm phân tích bằng các phương pháp, ví dụ, SDS-PAGE, sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) hoặc khối phổ.

SDS-PAGE

Hệ gel NuPAGE® Pre-Cast (Invitrogen) được sử dụng theo hướng dẫn của nhà sản xuất. Cụ thể, 10% hoặc 4-12% gel NuPAGE® Novex® Bis-TRIS Pre-Cast (độ pH=6,4) và NuPAGE® MES (gel khử, với chất phụ gia đệm chạy mẫu chống oxy hóa NuPAGE®) hoặc đệm chạy mẫu MOPS (gel không khử) được sử dụng.

CE-SDS

Độ tinh khiết và tính toàn vẹn kháng thể được phân tích bằng phương pháp CE-SDS sử dụng công nghệ vi chip chứa dịch Labchip (PerkinElmer, Mỹ). Vì thế, 5µL dung dịch kháng thể được tạo ra cho phân tích CE-SDS bằng cách sử dụng bộ kit chất phản ứng biểu hiện protein HT theo hướng dẫn của nhà sản xuất và được phân tích trên hệ thống LabChip GXII bằng cách sử dụng chip biểu hiện protein HT. Số liệu được phân tích bằng cách sử dụng phần mềm LabChip GX.

Sắc ký phân tích loại trừ theo kích cỡ

Sắc ký loại trừ theo kích cỡ (SEC) để xác định sự kết tụ và trạng thái oligome của các kháng thể được thực hiện bằng sắc ký HPLC. Một cách ngắn gọn, các kháng thể đã được tinh chế bằng protein A được đưa lên Tosoh TSKgel G3000SW trong NaCl 300 mM, chất đệm $\text{KH}_2\text{PO}_4/\text{K}_2\text{HPO}_4$ 50 mM (độ pH=7,5) trên hệ thống Dionex Ultimate® (Thermo Fischer Scientific), hoặc lên cột Superdex 200 (GE Healthcare) trong 2x PBS trên hệ thống Dionex HPLC. Kháng thể đã rửa giải được định lượng bằng độ hấp thụ UV và tích phân của các diện tích đỉnh. Chất chuẩn lọc gel BioRad Gel Filtration Standard 151–1901 được sử dụng làm chất chuẩn.

Khối phổ

Phần này mô tả việc xác định đặc điểm của kháng thể đặc hiệu kép nhấn mạnh vào sự lắp ráp chính xác của chúng. Các cấu trúc sơ cấp được mong đợi được phân tích bằng khối phổ ion hóa tia điện (ESI-MS) của kháng thể nguyên vẹn đã deglycosyl hóa và trong các trường hợp cụ thể của kháng thể được deglycosyl hóa/phân giải bằng LysC hạn chế.

Các kháng thể được deglycosyl hóa bằng N-Glycosidaza F trong chất đệm phosphat hoặc chất đệm Tris ở nhiệt độ 37°C trong thời gian tối đa 17 giờ ở nồng độ protein là 1mg/mL. Việc phân giải bằng LysC (Roche Diagnostics GmbH, Mannheim,

Đức) hạn chế được thực hiện với 100 μg kháng thể đã deglycosyl hóa trong chất đệm Tris (độ pH=8) ở nhiệt độ trong phòng trong 120 giờ, hoặc ở nhiệt độ 37°C trong 40 phút, một cách tương ứng. Trước khi đo khối phổ, các mẫu được khử muối bằng phương pháp HPLC trên cột Sephadex G25(GE Healthcare). Tổng khối lượng được xác định qua ESI-MS trên hệ thống maXis 4G UHR-QTOF MS (Bruker Daltonik) được lắp nguồn TriVersa NanoMate (Advion).

Thử nghiệm phân hủy hóa học

Mẫu được chia thành ba phần nhỏ và được đệm lại trong His 20 mM /His*HCl, NaCl 140 mM, độ pH=6,0 hoặc trong PBS, một cách tương ứng, và được lưu giữ ở nhiệt độ 40°C (His/NaCl) hoặc 37°C (PBS). Mẫu đối chứng được lưu giữ ở nhiệt độ -80°C.

Sau khi kết thúc thời gian ủ, mẫu được phân tích về nồng độ hoạt tính tương đối (BIAcore), sự kết tụ (SEC) và sự phân mảnh (điện di mao quản hoặc SDS-PAGE) và được so sánh với đối chứng chưa xử lý.

Độ ổn định nhiệt

Mẫu được tạo ra ở nồng độ là 1 mg/mL trong 20 mM Histidin/Histidin clorua, NaCl 140 mM, độ pH=6,0, được chuyển vào trong đĩa quang 384 giếng bằng cách ly tâm qua đĩa lọc 0,4 μm và được phủ bằng dầu parafin. Bán kính thủy động học được đo lặp lại nhiều lần bằng phương pháp đo tán xạ ánh sáng động học trên thiết bị đọc đĩa DynaPro (Wyatt) trong khi các mẫu được làm nóng với tốc độ 0,05°C/phút từ 25°C lên 80°C.

Theo cách khác, các mẫu được chuyển vào dãy microcuvet 10 μL và số liệu tán xạ ánh sáng tĩnh cũng như số liệu phát huỳnh quang khi kích thích bằng laze bước sóng 266 nm được ghi bằng thiết bị Optim1000 (Avacta Inc.), trong khi chúng được làm nóng ở tốc độ 0,1°C/phút từ 25°C lên 90°C.

Nhiệt độ bắt đầu kết tụ được định nghĩa là nhiệt độ mà tại đó bán kính thủy động học (DLS) hoặc cường độ ánh sáng tán xạ (Optim1000) bắt đầu tăng lên.

Theo cách khác, mẫu được chuyển vào dãy nhiều cuvet 9 μL . Dãy nhiều cuvet này được làm nóng từ 35°C lên 90°C ở tốc độ không đổi là 0,1°C/phút trong thiết bị Optim1000 (Avacta Analytical Inc.). Thiết bị này liên tục ghi cường độ ánh sáng tán xạ của laze 266 nm với điểm số liệu xấp xỉ mỗi 0,5°C. Cường độ tán xạ ánh sáng được vẽ

đồ thị theo nhiệt độ. Nhiệt độ bắt đầu kết tụ (T_{agg}) được định nghĩa là nhiệt độ mà tại đó cường độ ánh sáng tán xạ bắt đầu tăng lên.

Nhiệt độ nóng chảy được định nghĩa là điểm uốn trong đồ thị cường độ phát huỳnh quang so với bước sóng

Ví dụ 1

Biểu hiện và tinh chế

Kháng thể đặc hiệu kép được tạo ra như được mô tả ở trên trong phần nguyên liệu và phương pháp tổng quát.

Kháng thể đặc hiệu kép được tinh chế từ phân dịch nổi trên bề mặt bằng cách kết hợp phương pháp sắc ký ái lực protein A và phương pháp sắc ký loại trừ theo kích cỡ. Sản phẩm thu được được xác định đặc điểm về độ đồng nhất bằng khối phổ và đặc tính phân tích như độ tinh khiết bằng CE-SDS, hàm lượng monome và độ ổn định.

Các cấu trúc sơ cấp được mong đợi được phân tích bằng khối phổ ion hóa tia điện (ESI-MS) của kháng thể nguyên vẹn đã được deglycosyl hóa và được deglycosyl hóa/phân hủy bằng plasmin hoặc theo cách khác là kháng thể được deglycosyl hóa/phân hủy bằng LysC giới hạn như được mô tả trong phần các phương pháp tổng quát.

Các phương pháp phân tích bổ sung (ví dụ, độ ổn định nhiệt, khối phổ và đánh giá chức năng) chỉ được sử dụng sau khi tinh chế bằng protein A và SEC.

Ví dụ 2

Xác định khả năng gắn kết vào thụ thể transferin *in vitro*

Sự gắn kết của kháng thể đặc hiệu kép với thụ thể transferin của chuột được kiểm tra bằng phân tích FACS trên tế bào u tủy X63.AG8-563 của chuột nhắt. Nếu kháng thể A β thể hiện xu hướng nhất định với sự gắn kết không đặc hiệu vào tế bào Ag8, thì mức gắn kết đặc hiệu có thể được định lượng bằng cách ủ đồng thời với kháng thể kháng TfR của chuột với lượng dư 20 lần. Các tế bào được thu hoạch bằng cách ly tâm, được rửa một lần bằng PBS và 5×10^4 tế bào được ủ với dãy pha loãng 1,5 pM đến 10 nM của thể dung hợp polypeptit có hoặc không bổ sung kháng thể kháng TfR của chuột 200 nM trong 100 μ L RPMI/FCS 10% trong 1,5 giờ trên nước đá. Sau 2 lần rửa bằng RPMI/FCS 10%, các tế bào này được ủ với kháng thể dê kháng IgG của người được ghép cặp với

Phycoerythrin (Jackson ImmunoResearch) ở độ pha loãng 1:600 trong RPMI/FCS 19% trong thời gian 1,5 giờ trên nước đá. Các tế bào được rửa lần nữa, được tạo huyền phù lại trong RPMI/FCS 10% và mức độ phát huỳnh quang Phycoerythrin được đo trên thiết bị FACS-Array (Becton-Dickinson).

Ví dụ 3

Thử nghiệm gắn kết dựa trên cộng hưởng plasmon bề mặt đối với sự tương tác kháng thể TfR người

Thử nghiệm gắn kết này được thực hiện trên thiết bị BIAcore B 4000 (GE Healthcare) đã trang bị chip cảm biến C1 (GE Healthcare, số lô BR1005-35) được xử lý trước bằng kháng thể kháng Fab của người (GE Healthcare, số lô 28-9583-25) bằng cách sử dụng quy trình ghép cặp amin chuẩn theo hướng dẫn của nhà cung cấp.

Để đo động học, mẫu kháng thể được giữ cố định được bằng cách áp dụng thời gian tiếp xúc là 60 giây và tốc độ chảy là 10 $\mu\text{L}/\text{phút}$ trong nước muối được đệm phosphate độ pH=7,4, Tween 20 0,05% ở nhiệt độ 25°C. Thụ thể transferin của người được gắn His6 tái tổ hợp (hệ thống R&D, số lô 2474-TR-050) được sử dụng trong các nồng độ tăng và tín hiệu được kiểm soát theo thời gian. Thời gian trung bình kéo dài 150 giây đối với thời gian kết hợp và 600 giây đối với thời gian phân ly ở tốc độ dòng chảy là 30 $\mu\text{L}/\text{phút}$ được ghi. Số liệu được khớp bằng cách sử dụng mô hình gắn kết tỷ lệ 1:1 (Langmuir isotherm).

YÊU CẦU BẢO HỘ

1. Kháng thể đặc hiệu kép chứa:

- a) một kháng thể chứa hai cặp mỗi cặp gồm chuỗi nhẹ kháng thể và chuỗi nặng kháng thể, trong đó các vị trí gắn kết tạo ra bởi mỗi trong các cặp của chuỗi nặng và chuỗi nhẹ gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ nhất, và
- b) một mảnh Fab bổ sung, trong đó mảnh Fab bổ sung này được dung hợp với đầu tận C của một trong các chuỗi nặng của kháng thể, trong đó vị trí gắn kết của mảnh Fab bổ sung này gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai,

trong đó mỗi trong số các chuỗi nặng kháng thể chứa trong miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) ở vị trí 123 gốc axit amin arginin (thay cho gốc axit glutamic kiểu dại; đột biến E123R) và ở vị trí 124 gốc axit amin lysin (thay cho gốc glutamin kiểu dại; đột biến Q124K) (đánh số theo Kabat),

trong đó mỗi trong số các chuỗi nặng kháng thể chứa trong miền chuỗi nặng hằng định thứ nhất (CH1) ở vị trí 147 gốc axit glutamic (thay cho gốc lysin kiểu dại; đột biến K147E) và ở vị trí 213 gốc axit glutamic (thay cho gốc axit amin lysin kiểu dại; đột biến K213E) (đánh số theo chỉ số Kabat EU),

trong đó mảnh Fab bổ sung gắn kết đặc hiệu vào kháng nguyên thứ hai chứa miền trao đổi chéo sao cho miền chuỗi nhẹ hằng định (CL) và miền chuỗi nặng hằng định 1 (CH1) được thay thế cho nhau, và

trong đó kháng nguyên thứ nhất này là protein CD20 của người và kháng nguyên thứ hai là thụ thể transferrin của người.

2. Kháng thể theo điểm 1, trong đó mảnh Fab bổ sung được dung hợp với đầu tận C của chuỗi nặng bằng tác nhân liên kết peptit.

3. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm 1 và 2, trong đó:

- a) chuỗi nặng được dung hợp với mảnh Fab bổ sung có gốc axit amin chuỗi nặng đầu tận C là tripeptit LSP trong đó prolin của nó được dung hợp trực tiếp với gốc axit amin thứ nhất của mảnh Fab bổ sung hoặc của tác nhân liên kết peptit thông qua liên kết peptit, và

- b) chuỗi nặng không được dung hợp với mảnh Fab bổ sung có gốc axit amin chuỗi nặng đầu tận C là tripeptit LSP, hoặc SPG, hoặc PGK.
4. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 3, trong đó kháng thể này là:
- a) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người, hoặc
 - b) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người, hoặc
 - c) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G,
 - d) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P, L235E và P329G,
 - e) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A và P329G trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng còn lại tương ứng,
 - f) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG4 của người có các đột biến S228P và P329G trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng còn lại tương ứng,
 - g) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, I253A, H310A và H435A trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng còn lại tương ứng,
 - h) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, M252Y, S254T và T256E trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến T366W và S354C trong một chuỗi nặng và các đột biến T366S, L368A, Y407V và Y349C trong chuỗi nặng còn lại tương ứng, hoặc
 - i) kháng thể có chiều dài đầy đủ thuộc phân lớp IgG1 của người có các đột biến L234A, L235A, P329G, H310A, H433A và Y436A trong cả hai chuỗi nặng và các đột biến i) T366W, và ii) S354C hoặc Y349C, trong một chuỗi nặng

và các đột biến i) T366S, L368A, và Y407V, và ii) Y349C hoặc S354C, trong chuỗi nặng còn lại tương ứng.

5. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể đặc hiệu kép chứa:
 - i) chuỗi nhẹ có trình tự của SEQ ID NO: 01,
 - ii) chuỗi nặng có trình tự của SEQ ID NO: 02,
 - iii) chuỗi nhẹ có trình tự của SEQ ID NO: 03, và
 - iv) mảnh Fab chuỗi nặng có trình tự của SEQ ID NO: 04.
6. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 4, trong đó kháng thể đặc hiệu kép chứa chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 01, chuỗi nặng có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 02, chuỗi nhẹ có trình tự axit amin của SEQ ID NO: 03, và mảnh Fab kháng thể chứa trình tự axit amin của SEQ ID NO: 04.
7. Kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 6, trong đó kháng thể là kháng thể đơn dòng.
8. Dược phẩm chứa kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7 và chất mang dược dụng.
9. Thuốc để điều trị cho cá thể có bệnh xơ cứng rải rác chứa lượng có hiệu quả của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.
10. Thuốc để làm tiêu tế bào B tách ra từ não biểu hiện CD20 ở cá thể chứa lượng có hiệu quả của kháng thể theo điểm bất kỳ trong số các điểm từ 1 đến 7.

DANH MỤC TRÌNH TỰ

<110> F. Hoffmann-La Roche AG

<120> KHÁNG THỂ ĐẶC HIỆU KÉP KHÁNG CD20 CỦA NGƯỜI/THỤ THỂ
TRANSFERIN CỦA NGƯỜI VÀ DƯỢC PHẨM CHỨA KHÁNG THỂ NÀY

<130> P33110

<150> EP15188067.1

<151> 2015-10-02

<160> 22

<170> PatentIn version 3.5

<210> 1

<211> 219

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0041-LC1

<400> 1

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

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

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

Pro	Gln	Leu	Leu	Ile	Tyr	Gln	Met	Ser	Asn	Leu	Val	Ser	Gly	Val	Pro
	50					55					60				

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
 115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 2
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0041-HC1

<400> 2

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

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

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

Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	50	55	60
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95
Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140
Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	225	230	235
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255

33111

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 3
<211> 215
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0041-LC2

<400> 3

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser
 100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190

Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val Asp Lys
 195 200 205

Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
 210 215

<210> 4
 <211> 229
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0041-Fab

<400> 4

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 130 135 140

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 145 150 155 160

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 165 170 175

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 195 200 205

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 210 215 220

Asn Arg Gly Glu Cys
 225

<210> 5
 <211> 297
 <212> PRT
 <213> Homo sapiens

<400> 5

Met Thr Thr Pro Arg Asn Ser Val Asn Gly Thr Phe Pro Ala Glu Pro
 1 5 10 15

Met Lys Gly Pro Ile Ala Met Gln Ser Gly Pro Lys Pro Leu Phe Arg
 20 25 30

Arg Met Ser Ser Leu Val Gly Pro Thr Gln Ser Phe Phe Met Arg Glu
 35 40 45

Ser Lys Thr Leu Gly Ala Val Gln Ile Met Asn Gly Leu Phe His Ile
 50 55 60

Ala Leu Gly Gly Leu Leu Met Ile Pro Ala Gly Ile Tyr Ala Pro Ile

33111

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

33111

275

280

285

Ser Pro Ile Glu Asn Asp Ser Ser Pro
290 295

<210> 6
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0039-LC1

<400> 6

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
210 215

<210> 7
<211> 448
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0039-HC1

<400> 7

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

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

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

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

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

Met Glu Leu Ser Ser Leu Arg Ser Glu Asp Thr Ala Val Tyr Tyr Cys

33111

85

90

95

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
 115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
 130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp
 145 150 155 160

Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu
 165 170 175

Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser
 180 185 190

Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro
 195 200 205

Ser Asn Thr Lys Val Asp Glu Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys Asp Lys
 210 215 220

Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro
 225 230 235 240

Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser
 245 250 255

Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp
 260 265 270

Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn
 275 280 285

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val

33111

290

295

300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 8

<211> 229

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0039-LC2

<400> 8

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 130 135 140

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 145 150 155 160

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 165 170 175

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 195 200 205

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 210 215 220

Asn Arg Gly Glu Cys
225

<210> 9
<211> 681
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0039-HC2

<400> 9

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe
115 120 125

Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu
130 135 140

Gly Cys Leu Val Glu Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp

145					150					155				160	
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys
	210					215					220				
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro
225					230					235					240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser
				245					250					255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325					330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp

33111

355		360		365											
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
370						375					380				
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
385					390					395					400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				405					410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
			420					425					430		
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
		435					440					445			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
450						455					460				
Gly	Ser	Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser	Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser
465					470					475					480
Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys	Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser
				485					490					495	
Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys	Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu
			500					505					510		
Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala	Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe
		515					520					525			
Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe	Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu
530						535					540				
Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr	Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	Ala	Ser
545					550					555					560
Ser	Asn	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Gly	Gly	Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys

33111

565

570

575

Ser Ser Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser
580 585 590

Ser Lys Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys
595 600 605

Asp Tyr Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu
610 615 620

Thr Ser Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu
625 630 635 640

Tyr Ser Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr
645 650 655

Gln Thr Tyr Ile Cys Asn Val Asn His Lys Pro Ser Asn Thr Lys Val
660 665 670

Asp Lys Lys Val Glu Pro Lys Ser Cys
675 680

<210> 10

<211> 695

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0041-HC2

<400> 10

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

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

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

Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe	50	55	60	
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr	65	70	75	80
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	

Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp
			260					265					270		
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn
		275					280					285			
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val
	290					295					300				
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu
305					310					315					320
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys
				325					330					335	
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Tyr	Thr
			340					345					350		
Leu	Pro	Pro	Cys	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Trp
		355					360					365			
Cys	Leu	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu
	370					375					380				
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu
385					390					395					400
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Tyr	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys
				405					410					415	
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu
			420					425					430		
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly
		435					440					445			
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly
	450					455					460				

Gly	Ser	Gln	Ser	Met	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser
465					470					475					480
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser
				485					490					495	
Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp
			500					505					510		
Ile	Gly	Tyr	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala
		515					520					525			
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Ser	Leu	Lys
	530					535					540				
Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg
545					550					555					560
Arg	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp
				565					570					575	
Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala
			580					585					590		
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser
		595					600					605			
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu
	610					615					620				
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser
625					630					635					640
Gln	Glu	Ser	Val	Thr	Glu	Gln	Asp	Ser	Lys	Asp	Ser	Thr	Tyr	Ser	Leu
				645					650					655	
Ser	Ser	Thr	Leu	Thr	Leu	Ser	Lys	Ala	Asp	Tyr	Glu	Lys	His	Lys	Val
			660					665					670		

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
 675 680 685

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 690 695

<210> 11
 <211> 219
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0040-LC1

<400> 11

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu
 115 120 125

Gln Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe

33111

130 135 140
 Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160
 Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175
 Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190
 Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205
 Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

 <210> 12
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

 <220>
 <223> 0040-HC1

 <400> 12

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

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

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

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

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

Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	85	90	95	
Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly	100	105	110	
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe	115	120	125	
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu	130	135	140	
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp	145	150	155	160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu	165	170	175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser	180	185	190	
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	195	200	205	
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys	210	215	220	
Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	Gly	Pro	225	230	235	240
Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	Ile	Ser	245	250	255	
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp	260	265	270	
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn	275	280	285	

Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val
290 295 300

Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu
305 310 315 320

Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys
325 330 335

Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Cys Thr
340 345 350

Leu Pro Pro Ser Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Ser
355 360 365

Cys Ala Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu
370 375 380

Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu
385 390 395 400

Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Val Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys
405 410 415

Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu
420 425 430

Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser Pro Gly
435 440 445

<210> 13

<211> 695

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0040-HC2

<400> 13

Gln Val Gln Leu Val Gln Ser Gly Ala Glu Val Lys Lys Pro Gly Ser

1		5		10		15													
Ser	Val	Lys	Val	Ser	Cys	Lys	Ala	Ser	Gly	Tyr	Ala	Phe	Ser	Tyr	Ser				
		20						25					30						
Trp	Ile	Asn	Trp	Val	Arg	Gln	Ala	Pro	Gly	Gln	Gly	Leu	Glu	Trp	Met				
		35					40					45							
Gly	Arg	Ile	Phe	Pro	Gly	Asp	Gly	Asp	Thr	Asp	Tyr	Asn	Gly	Lys	Phe				
	50					55					60								
Lys	Gly	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Ala	Asp	Lys	Ser	Thr	Ser	Thr	Ala	Tyr				
65					70					75					80				
Met	Glu	Leu	Ser	Ser	Leu	Arg	Ser	Glu	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys				
				85					90					95					
Ala	Arg	Asn	Val	Phe	Asp	Gly	Tyr	Trp	Leu	Val	Tyr	Trp	Gly	Gln	Gly				
			100					105					110						
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe				
		115					120					125							
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu				
	130					135					140								
Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp				
145					150					155					160				
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu				
				165					170					175					
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser				
			180					185					190						
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro				
		195					200					205							
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Lys				

210		215		220
Thr His Thr Cys Pro Pro Cys Pro Ala Pro Glu Ala Ala Gly Gly Pro				
225		230		235 240
Ser Val Phe Leu Phe Pro Pro Lys Pro Lys Asp Thr Leu Met Ile Ser				
	245		250	255
Arg Thr Pro Glu Val Thr Cys Val Val Val Asp Val Ser His Glu Asp				
	260		265	270
Pro Glu Val Lys Phe Asn Trp Tyr Val Asp Gly Val Glu Val His Asn				
	275		280	285
Ala Lys Thr Lys Pro Arg Glu Glu Gln Tyr Asn Ser Thr Tyr Arg Val				
	290		295	300
Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly Lys Glu				
305		310		315 320
Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile Glu Lys				
	325		330	335
Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val Tyr Thr				
	340		345	350
Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser Leu Trp				
	355		360	365
Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu Trp Glu				
	370		375	380
Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro Val Leu				
385		390		395 400
Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val Asp Lys				
	405		410	415
Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met His Glu				

				420					425					430				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly			
		435					440					445						
Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly			
	450					455						460						
Gly	Ser	Gln	Ser	Met	Gln	Glu	Ser	Gly	Pro	Gly	Leu	Val	Lys	Pro	Ser			
465					470					475					480			
Gln	Thr	Leu	Ser	Leu	Thr	Cys	Thr	Val	Ser	Gly	Phe	Ser	Leu	Ser	Ser			
				485					490					495				
Tyr	Ala	Met	Ser	Trp	Ile	Arg	Gln	His	Pro	Gly	Lys	Gly	Leu	Glu	Trp			
			500					505					510					
Ile	Gly	Tyr	Ile	Trp	Ser	Gly	Gly	Ser	Thr	Asp	Tyr	Ala	Ser	Trp	Ala			
		515					520					525						
Lys	Ser	Arg	Val	Thr	Ile	Ser	Lys	Thr	Ser	Thr	Thr	Val	Ser	Leu	Lys			
	530					535					540							
Leu	Ser	Ser	Val	Thr	Ala	Ala	Asp	Thr	Ala	Val	Tyr	Tyr	Cys	Ala	Arg			
545					550					555					560			
Arg	Tyr	Gly	Thr	Ser	Tyr	Pro	Asp	Tyr	Gly	Asp	Ala	Ser	Gly	Phe	Asp			
				565					570					575				
Pro	Trp	Gly	Gln	Gly	Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Val	Ala			
			580					585					590					
Ala	Pro	Ser	Val	Phe	Ile	Phe	Pro	Pro	Ser	Asp	Glu	Gln	Leu	Lys	Ser			
		595					600					605						
Gly	Thr	Ala	Ser	Val	Val	Cys	Leu	Leu	Asn	Asn	Phe	Tyr	Pro	Arg	Glu			
	610					615					620							
Ala	Lys	Val	Gln	Trp	Lys	Val	Asp	Asn	Ala	Leu	Gln	Ser	Gly	Asn	Ser			

33111

625

630

635

640

Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu
645 650 655

Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val
660 665 670

Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys
675 680 685

Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
690 695

<210> 14
<211> 219
<212> PRT
<213> Trình tự nhân tạo

<220>
<223> 0042-LC1

<400> 14

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

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

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

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
50 55 60

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

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

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

Arg Thr Val Ala Ala Pro Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Arg
 115 120 125

Lys Leu Lys Ser Gly Thr Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe
 130 135 140

Tyr Pro Arg Glu Ala Lys Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln
 145 150 155 160

Ser Gly Asn Ser Gln Glu Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser
 165 170 175

Thr Tyr Ser Leu Ser Ser Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu
 180 185 190

Lys His Lys Val Tyr Ala Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser
 195 200 205

Pro Val Thr Lys Ser Phe Asn Arg Gly Glu Cys
 210 215

<210> 15
 <211> 448
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0042-HC1

<400> 15

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

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

Trp Ile Asn Trp Val Arg Gln Ala Pro Gly Gln Gly Leu Glu Trp Met

33111

[illegible]

33111

				245					250						255		
Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	Glu	Asp		
			260						265				270				
Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	His	Asn		
		275					280					285					
Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	Arg	Val		
	290					295					300						
Val	Ser	Val	Leu	Thr	Val	Leu	His	Gln	Asp	Trp	Leu	Asn	Gly	Lys	Glu		
305					310					315					320		
Tyr	Lys	Cys	Lys	Val	Ser	Asn	Lys	Ala	Leu	Gly	Ala	Pro	Ile	Glu	Lys		
				325					330					335			
Thr	Ile	Ser	Lys	Ala	Lys	Gly	Gln	Pro	Arg	Glu	Pro	Gln	Val	Cys	Thr		
			340					345					350				
Leu	Pro	Pro	Ser	Arg	Asp	Glu	Leu	Thr	Lys	Asn	Gln	Val	Ser	Leu	Ser		
		355					360					365					
Cys	Ala	Val	Lys	Gly	Phe	Tyr	Pro	Ser	Asp	Ile	Ala	Val	Glu	Trp	Glu		
	370					375					380						
Ser	Asn	Gly	Gln	Pro	Glu	Asn	Asn	Tyr	Lys	Thr	Thr	Pro	Pro	Val	Leu		
385					390					395					400		
Asp	Ser	Asp	Gly	Ser	Phe	Phe	Leu	Val	Ser	Lys	Leu	Thr	Val	Asp	Lys		
				405					410					415			
Ser	Arg	Trp	Gln	Gln	Gly	Asn	Val	Phe	Ser	Cys	Ser	Val	Met	His	Glu		
			420					425					430				
Ala	Leu	His	Asn	His	Tyr	Thr	Gln	Lys	Ser	Leu	Ser	Leu	Ser	Pro	Gly		
		435					440						445				

$\langle 210 \rangle$ 16

<211> 229
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0042-LC2

<400> 16

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser Ala Ser Val Ala Ala Pro
 115 120 125

Ser Val Phe Ile Phe Pro Pro Ser Asp Glu Gln Leu Lys Ser Gly Thr
 130 135 140

Ala Ser Val Val Cys Leu Leu Asn Asn Phe Tyr Pro Arg Glu Ala Lys
 145 150 155 160

Val Gln Trp Lys Val Asp Asn Ala Leu Gln Ser Gly Asn Ser Gln Glu
 165 170 175

Ser Val Thr Glu Gln Asp Ser Lys Asp Ser Thr Tyr Ser Leu Ser Ser
 180 185 190

Thr Leu Thr Leu Ser Lys Ala Asp Tyr Glu Lys His Lys Val Tyr Ala
 195 200 205

Cys Glu Val Thr His Gln Gly Leu Ser Ser Pro Val Thr Lys Ser Phe
 210 215 220

Asn Arg Gly Glu Cys
 225

<210> 17
 <211> 674
 <212> PRT
 <213> Trình tự nhân tạo

<220>
 <223> 0042-HC2

<400> 17

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

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

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

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

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

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

Ala Arg Asn Val Phe Asp Gly Tyr Trp Leu Val Tyr Trp Gly Gln Gly

100								105				110			
Thr	Leu	Val	Thr	Val	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	Val	Phe
		115					120					125			
Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	Ala	Leu
	130					135					140				
Gly	Cys	Leu	Val	Glu	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	Ser	Trp
145					150					155					160
Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	Val	Leu
				165					170					175	
Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	Pro	Ser
			180					185					190		
Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro
		195					200					205			
Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Glu	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	Asp	Gly
	210					215					220				
Gly	Gly	Gly	Ser	Gly	Gly	Gly	Gly	Ser	Ala	Ile	Gln	Leu	Thr	Gln	Ser
225					230					235					240
Pro	Ser	Ser	Leu	Ser	Ala	Ser	Val	Gly	Asp	Arg	Val	Thr	Ile	Thr	Cys
				245					250					255	
Arg	Ala	Ser	Gln	Ser	Ile	Ser	Ser	Tyr	Leu	Ala	Trp	Tyr	Gln	Gln	Lys
			260					265					270		
Pro	Gly	Lys	Ala	Pro	Lys	Leu	Leu	Ile	Tyr	Arg	Ala	Ser	Thr	Leu	Ala
		275					280					285			
Ser	Gly	Val	Pro	Ser	Arg	Phe	Ser	Gly	Ser	Gly	Ser	Gly	Thr	Asp	Phe
	290					295					300				
Thr	Leu	Thr	Ile	Ser	Ser	Leu	Gln	Pro	Glu	Asp	Phe	Ala	Thr	Tyr	Tyr

305						310						315				320
Cys	Gln	Gln	Asn	Tyr	Ala	Ser	Ser	Asn	Val	Asp	Asn	Thr	Phe	Gly	Gly	
				325					330					335		
Gly	Thr	Lys	Val	Glu	Ile	Lys	Ser	Ser	Ala	Ser	Thr	Lys	Gly	Pro	Ser	
			340					345					350			
Val	Phe	Pro	Leu	Ala	Pro	Ser	Ser	Lys	Ser	Thr	Ser	Gly	Gly	Thr	Ala	
		355					360					365				
Ala	Leu	Gly	Cys	Leu	Val	Lys	Asp	Tyr	Phe	Pro	Glu	Pro	Val	Thr	Val	
	370					375					380					
Ser	Trp	Asn	Ser	Gly	Ala	Leu	Thr	Ser	Gly	Val	His	Thr	Phe	Pro	Ala	
385					390					395					400	
Val	Leu	Gln	Ser	Ser	Gly	Leu	Tyr	Ser	Leu	Ser	Ser	Val	Val	Thr	Val	
				405					410					415		
Pro	Ser	Ser	Ser	Leu	Gly	Thr	Gln	Thr	Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	
			420					425					430			
Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys	Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys	
		435					440					445				
Asp	Lys	Thr	His	Thr	Cys	Pro	Pro	Cys	Pro	Ala	Pro	Glu	Ala	Ala	Gly	
	450					455						460				
Gly	Pro	Ser	Val	Phe	Leu	Phe	Pro	Pro	Lys	Pro	Lys	Asp	Thr	Leu	Met	
465					470					475					480	
Ile	Ser	Arg	Thr	Pro	Glu	Val	Thr	Cys	Val	Val	Val	Asp	Val	Ser	His	
				485					490					495		
Glu	Asp	Pro	Glu	Val	Lys	Phe	Asn	Trp	Tyr	Val	Asp	Gly	Val	Glu	Val	
			500					505					510			
His	Asn	Ala	Lys	Thr	Lys	Pro	Arg	Glu	Glu	Gln	Tyr	Asn	Ser	Thr	Tyr	

33111

515

520

525

Arg Val Val Ser Val Leu Thr Val Leu His Gln Asp Trp Leu Asn Gly
530 535 540

Lys Glu Tyr Lys Cys Lys Val Ser Asn Lys Ala Leu Gly Ala Pro Ile
545 550 555 560

Glu Lys Thr Ile Ser Lys Ala Lys Gly Gln Pro Arg Glu Pro Gln Val
565 570 575

Tyr Thr Leu Pro Pro Cys Arg Asp Glu Leu Thr Lys Asn Gln Val Ser
580 585 590

Leu Trp Cys Leu Val Lys Gly Phe Tyr Pro Ser Asp Ile Ala Val Glu
595 600 605

Trp Glu Ser Asn Gly Gln Pro Glu Asn Asn Tyr Lys Thr Thr Pro Pro
610 615 620

Val Leu Asp Ser Asp Gly Ser Phe Phe Leu Tyr Ser Lys Leu Thr Val
625 630 635 640

Asp Lys Ser Arg Trp Gln Gln Gly Asn Val Phe Ser Cys Ser Val Met
645 650 655

His Glu Ala Leu His Asn His Tyr Thr Gln Lys Ser Leu Ser Leu Ser
660 665 670

Pro Gly

<210> 18

<211> 119

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể VH kháng CD20

<400> 18

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

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

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

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

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

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

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

Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
115

<210> 19

<211> 112

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> Kháng thể VL kháng CD20

<400> 19

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

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

Asn Gly Ile Thr Tyr Leu Tyr Trp Tyr Leu Gln Lys Pro Gly Gln Ser

35

40

45

Pro Gln Leu Leu Ile Tyr Gln Met Ser Asn Leu Val Ser Gly Val Pro
 50 55 60

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

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

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

<210> 20

<211> 122

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-023 VH biến thể làm giống người_DASG

<400> 20

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

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

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

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

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

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

Gly Thr Ser Tyr Pro Asp Tyr Gly Asp Ala Ser Gly Phe Asp Pro Trp
 100 105 110

Gly Gln Gly Thr Leu Val Thr Val Ser Ser
 115 120

<210> 21

<211> 110

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 299-009 VL biến thể làm giống người_NYA

<400> 21

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys
 100 105 110

<210> 22

<211> 215

<212> PRT

<213> Trình tự nhân tạo

<220>

<223> 0040-LC2

<400> 22

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

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

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

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

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

Glu Asp Phe Ala Thr Tyr Tyr Cys Gln Gln Asn Tyr Ala Ser Ser Asn
 85 90 95

Val Asp Asn Thr Phe Gly Gly Gly Thr Lys Val Glu Ile Lys Ser Ser
 100 105 110

Ala Ser Thr Lys Gly Pro Ser Val Phe Pro Leu Ala Pro Ser Ser Lys
 115 120 125

Ser Thr Ser Gly Gly Thr Ala Ala Leu Gly Cys Leu Val Lys Asp Tyr
 130 135 140

Phe Pro Glu Pro Val Thr Val Ser Trp Asn Ser Gly Ala Leu Thr Ser
 145 150 155 160

Gly Val His Thr Phe Pro Ala Val Leu Gln Ser Ser Gly Leu Tyr Ser
 165 170 175

Leu Ser Ser Val Val Thr Val Pro Ser Ser Ser Leu Gly Thr Gln Thr
 180 185 190

Tyr	Ile	Cys	Asn	Val	Asn	His	Lys	Pro	Ser	Asn	Thr	Lys	Val	Asp	Lys
		195					200					205			

Lys	Val	Glu	Pro	Lys	Ser	Cys
210						215